

УНИВЕРЗИТЕТ „ГОЦЕ ДЕЛЧЕВ” – ШТИП
ЗЕМЈОДЕЛСКИ ФАКУЛТЕТ
Катедра за заштита на растенијата и животната средина
Штип

Ковачевиќ Билјана

ПРОУЧУВАЊЕ НА ПРИЧИНТЕЛОТ НА НЕКРОЗАТА НА
СТЕБЛЕНАТА СРЖ НА ДОМАТОТ - *PSEUDOMONAS MEDITERRANEA*
SATTARA ET AL., 2002, ВО МАКЕДОНИЈА

- МАГИСТЕРСКИ ТРУД -

Штип, Јуни 2010

Комисија за оценка и одбрана

Претседател: Илија Каров
Редовен професор, Земјоделски факултет, УГД-Штип

Член (ментор): Саша Митрев
Редовен професор, Земјоделски факултет, УГД-Штип

Член: Душан Спасов
Доцент доктор, Земјоделски факултет, УГД-Штип

Научно поле: Фитопатологија

Научна област: Бактериологија

Датум на одбрана:

Датум на промоција:

*Ова дело го посветувам на
мојот ментор и Ректор на УГД – Штип,
Проф. д-р Саша Митрев,
човекот кој успеа да направи еден сон да стане стварност.*

Воедно, би сакала да изразам голема благодарност до:

*Деканот на земјоделскиот Факултет
кој несебично ми го пренесе своето искуство и знаење,
Проф. д-р Илија Каров*

и

*човекот кој има голема улога во
откривањето на овој проблем
Доц. д-р Душан Спасов*

Објавени трудови произлезени од истражувањето и презентации од научни собири:

1. Митрев, С., Билјана Ковачевиќ, Емилија Накова, Спасов Д. (2007). *Pseudomonas agglomerans* и *Pseudomonas* sp., причинители на гниење на стеблото кај домотот. Заштита на растенијата XIX, Скопје, 94-98.
2. Mitrev Sasa, Biljana Kovacevik, Spasov Dusan, Zlatkovski Vasko (2010). Evaluation of some possibilities to suppress *Pseudomonas mediterranea* and *Phytium* spp. In organic agriculture. International conference on organic agriculture in scope of invironmental problems. 03 – 07 February, 2010. Famagusta, Cyprus, Island.
3. Саша Митрев, Билјана Ковачевиќ, Душан Спасов и Илија Каров (2010): Идентификација на *Pseudomonas viridiflava* (Burkholder) Dowson, еден од причинителите на гниење на стеблото кај домотот во Струмичкиот регион. Универзитет Гоце Делчев – Штип, Земјоделски факултет. Годишен зборник IX, (in press).
4. Mitrev S., Biljana Kovacevik, Karov I., Emilija Kostadinovska, and Spasov D. (2010). Characterization of *Pseudomonas mediterranea* Cattara et al. 2002, isolated from tomato plants and soil in Macedonia. Journal of Plant Pathology. (in press).

ПРОУЧУВАЊЕ НА ПРИЧИНТЕЛОТ НА НЕКРОЗАТА НА СТЕБЛЕНАТА СРЖ НА ДОМАТОТ - *PSEUDOMONAS MEDITERRANEA* CATTARA ET AL., 2002, ВО МАКЕДОНИЈА

Краток извадок

Во текот на последниве неколку години, од 2005 до 2009 следена е здравствената состојба на доматиите одгледувани во пластеници во Струмичкиот регион. За прв пат во текот на ова истражување забележана е појава на некроза на стеблената срж кај доматиот, симптом којшто во светот е познат под називот „Tomato Pith Necrosis“ – TPN. Од симптоматичните растенија, со стандардна постапка е изолирана бактеријата *Pseudomonas mediteranea*. Неколку години подоцна, поточно во 2009 година истата бактерија е изолирана и од почва, од пластеници каде што се забележани заболени растенија.

Испитувани се вкупно 22 изолата: девет изолати, изолирани од симптоматични растенија (Ds-4, Ds-4/1, Ds-4/2, Ds-12, Ds-12/1, Ds-12/2, Ds-13, Ds-13/1 и Ds-13/2); четири изолата, изолирани од почва (S-2.1, S-2.2, S-2.3 и S-2.4); по една позитивна контрола од Италија и Турција (IPVCT 9.1, P.m); една контрола *P. corrugata* (IPVCT 10.3) со потекло од Италија, и негативните контроли кои се набавени од Белгиска колекција на микроорганизми: *Clavibacter mishiganensis* subsp. *michiganensis* (LMG 2891), *Pantoea agglomerans* (LMG 2595), *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (LMG 5085), *Pseudomonas viridiflava* (LMG 5396), *Pseudomonas fluorescence* (LMG 5396) и *Pseudomonas marginalis* (LMG 5850).

Во *in vitro* услови, е испитувана патогеноста на изолатите, можноста да предизвикаат појава на хиперсензибилна реакција на листови од тутун и реакција по грам. Потоа, испитувани се: одгледувачките карактеристики на различни подлоги, развојот на температура од 4 и 41°C, толерантност спрема 5% и 7% NaCl, хидролиза на скроб, разлагање на желатин, создавање на амонијак, создавање на H₂S од пептони, создавање на индол, редукција на нитрати, хидролиза на ескулин и акумулација на poly-β-hydroxybutyrate.

Од биохемиско-физиолошките одлики на изолатите проучувани се: пектолитичка активност на плочки од компир, активност на оксидаза, активност на каталаза, оксидативно ферментативен тест, дехидролиза на аргинин, активност на уреаза, осетливост спрема CuSO_4 и стрептомицинсулфат. Со помош на BIOLOG тест е испитувана можноста од користење на 96 јаглени хидрати и киселини, а со мултиплекс PCR и двата типа на прајмери според Cattara et al., 2000 (тип еден: PC 1/1, PC 1/2 и тип два: PC 5/1 и PC 5/2), направени се генетски анализи и конечна идентификација на патогенот. Добиените резултати покажаа дека се работи за нов вид на бактерија, чие што присуство до сега не е утврдено во Република Македонија. Сите тринаесет испитувани изолата со потекло од Македонија, му припаѓаат на видот *Pseudomonas mediterranea*.

Врз основа на добиените резултати од 124 анализи, направена е статистичка обработка на податоците со помош на NTSYSpc програмот. Работено е со коефициент по Dice, и методот UPGM. Крајниот резултат покажа дека сите испитувани изолати од видот *P. mediterranea* и *P. corrugata* се групирани во еден кластер со индекс на сличност 0.937. Во рамките на овој кластер изолатите се поделени на три по сродни групи (А, Б, В). Во групата А се наоѓаат контролните изолати IPVCT 10.3, IPVCT 9.1 и P.m со индекс на сличност од 0.958. Во групата Б со индекс на сличност од 0.976 се наоѓаат изолатите Ds-4, Ds-4/1, Ds-4/2, S-2.1, S-2.2, S-2.3 и S-2.4, а во групата В со индекс на сличност од 0.982, припаѓаат изолатите Ds-12, Ds-12/1, Ds-12/2, Ds-13, Ds-13/1 и Ds-13/2.

Клучни зборови: патогеност, фенотипски карактеристики, BIOLOG, PCR.

INVESTIGATION OF CAUSER OF TOMATO PITH NECROSIS - *PSEUDOMONAS MEDITERRANEA* CATTARA ET AL. 2002, IN REPUBLIC OF MACEDONIA

Abstract

Last several years from 2005 – 2009 the health condition of tomato plants is monitored in the region of Strumica. During this period, symptoms of Tomato Pith Necrosis – TPN, are observed for the first time at tomatoes grown in plasticgreen houses. A ubiquitous bacterium *Pseudomonas mediterranea* is isolated by standard procedure from the symptomatic tomato plants. Several years later, in 2009 the same bacterium is isolated from the soil, too.

A total number of 22 isolates are investigated: nine strains isolated from the symptomatic plants (Ds-4, Ds-4/1, Ds-4/2, Ds-12, Ds-12/1, Ds-12/2, Ds-13, Ds-13/1 and Ds-13/2); four isolates from soil (S-2.1, S-2.2, S-2.3 и S-2.4); one positive control from Italy and one from Turkey (IPVCT 9.1, P.m); one control of *P. corrugata* (IPVCT 10.3) from Italy, and several negative controls obtained from the Belgium collection of microorganisms: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (LMG 2891), *Pantoea agglomerans* (LMG 2595), *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (LMG 5085), *Pseudomonas viridiflava* (LMG 5396), *Pseudomonas fluorescence* (LMG 5396) and *Pseudomonas marginalis* (LMG 5850).

In *in vitro* conditions, are examined: pathogenicity of the isolates, hypersensitive reaction of tobacco, gram reaction, growth characteristics on different media, bacterial growth at 4 and 41°C, tolerance of 5% and 7% NaCl, starch hydrolysis, gelatin lignifications, ammonia formation, formation of H₂S from peptones, indol, nitrate reduction, aesculine hydrolysis and accumulation of poly-β-hydroxybuturate.

Examined biochemical-physiological characteristics are: pectolitic activity on potato slices, oxidase activity, catalase activity, oxidative-fermentative test, dehidrolisis of arginie, urease activity, sensitivity to CuSO₄ and streptomycin sulphate. The utilization of 96 different carbon dioxides and acids is investigated by BIOLOG tests. Genetic analysis, and final

determination is obtained with multiplex PCR and two types of primers, according to Cattara et al., 2000 (Type I (PC5/1 and PC 5/2) and Type II (PC1/1 and PC 1/2). The result show the presence of new bacterial variety, not identified before in the Republic of Macedonia. All thirteen isolates from Macedonia, belongs to the variety of *Pseudomonas mediterranea*.

A total number of 124 characteristics from 22 strains are used for the numerical taxonomy analysis (NTSYSpc version 2r, software package, Exeter Software, NY, USA): biochemical and physiological characteristics, resistance to copper and antibiotics, results obtained using BIOLOG plates, and introduction of HR in tobacco. The distance matrix is calculated by using the DICE coefficient and the cluster analysis is performed using the UPGMA (Rohlf, 1994).

Final result show that all investigated isolates from the variety of *Pseudomonas mediterranea* and *Pseudomonas corrugata* are grouped in one cluster with index of similarity of 0.937, in which the isolates are divided in three groups: A, B, and C. In the group A with the similarity index of 0.958, belongs control isolates IPVCT 9.1, IPVCT 10.3, and P.m. In the group B with the similarity index of 0.976, are Ds-4, Ds-4/1, Ds-4/2, S-2.1, S-2.2, S-2.3 and S-2.4. In the group C, with the similarity index of 0.982, belongs Ds-12, Ds-12/1, Ds-12/2, Ds-13, Ds-13/1 and Ds-13/2.

Keywords: pathogenicity, phenotypic characteristics, BIOLOG, PCR.

СОДРЖИНА

1. Вовед.....	1
2. Преглед на литература.....	5
3. Цел на истражувањето.....	19
4. Методи на истражувачката работа.....	21
4.1 Општа техника користена во работата.....	21
4.2 Изолирање на бактериите.....	21
4.2.1 Изолирање на бактериите од растителен материјал.....	21
4.2.2 Изолирање на бактериите од почва.....	22
4.3 Определување на патогените одлики на испитуваните изолати..	23
4.3.1 Проверка на патогеноста на листови од тутун.....	23
4.3.2 Проверка на патогеноста на листови од малофа.....	23
4.3.3 Проверка на патогеноста на растенија од домат.....	23
4.4 Одгледувачки одлики на изолатите.....	24
4.4.1 Боење според Грам.....	26
4.4.2 Создавање на леван.....	26
4.4.3 Создавање на флуоресцентен пигмент.....	26
4.4.4 Развој на соодветна температура.....	27
4.4.5 Толерантност спрема 5% и 7% NaCl.....	27
4.4.6 Хидролиза на скроб.....	27
4.4.7 Разлагање на желатин.....	28
4.4.8 Создавање на амонијак.....	29
4.4.9 Создавање на H ₂ S од пептони.....	29
4.4.10 Создавање на индол.....	30
4.4.11 Редукција на нитрати.....	30
4.4.12 Хидролиза на ескулин.....	31
4.4.13 Акумулација на Poly-β-hydroxybutyrate (PHB).....	31
4.5 Проучување на биохемиско-физиолошките одлики на изолатите	32
4.5.1 Пектолитичка активност на плочки од компир.....	32
4.5.2 Активност на оксидаза.....	33
4.5.3 Активност на каталаза.....	33
4.5.4 Оксидативно ферментативен тест (О/Ф – тест).....	33

4.5.5 Дехидролиза на аргинин.....	34
4.5.6 Активност на уреаза.....	34
4.5.7 Осетливост спрема CuSO ₄ и стрептомицинсулфат.....	35
4.5.8 Користење на јаглени хидрати.....	36
4.5.9 BIOLOG тест.....	37
4.6 Идентификација врз основа на генетските карактеристики.....	38
4.6.1 Polimerase Chain Reaction (PCR).....	38
4.6.1.1 Multiplex PCR протокол за идентификација на <i>Pseudomonas corrugata</i> и <i>Pseudomonas mediteranea</i>	38
4.6.1.2 Подготовка на бактериите.....	38
4.6.1.3 Подготовка на микс.....	39
4.6.1.4 Изолирање на ДНА.....	39
4.6.1.5 PCR протокол.....	39
4.6.1.6 Анализирање на примероците.....	40
4.7 Статистичка обработка на податоците.....	40
4.7.1 Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System–NTSYSpc	40
5. РЕЗУЛТАТИ.....	41
5.1 Распространетост и економско значење.....	41
5.2 Симптоми на болеста.....	42
5.3 Изолација и општи карактеристики на добиените изолати.....	43
5.3.1 Патогени карактеристики на добиените изолати.....	44
5.3.1.1 Реакција на хиперсензибилност на листови од тутун.....	44
5.3.1.2 Инокулација со убод во стеблото.....	44
5.3.1.3 Инокулација со убод во аксилот.....	45
5.3.1.4 Патогени карактеристики кај реизолатите.....	45
5.5 LOPAT и грам-карактеристики на изолатите.....	45
5.6 Одгледувачки карактеристики на изолатите.....	47
5.6.1 Изглед на колониите на подлога NA.....	47
5.6.2 Изглед на колониите на подлога YDCA.....	49
5.7 Биохемиско-физиолошки одлики на изолатите.....	50
5.8 BIOLOG карактеристики.....	51
5.9 Генетски карактеристики на изолатите.....	57
5.10 Статистичка обработка на податоците.....	58

5.10.1 Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System-NTSYSpc	58
6. ДИСКУСИЈА.....	59
7. ЗАКЛУЧОК.....	66
8. ДОДАТОК.....	67
9. КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА.....	99

1. ВОВЕД

Република Македонија во текот на целата година, е значаен производител на голем број градинарски култури од кои најзастапени се: домотот, пиперката и краставицата. Сè до шеесетите години од минатиот век овие култури се одгледуваа само во полски услови. Но, во поново време, тие се одгледуваат и во оранжери и пластеници, задоволувајќи ги потребите на домашниот пазар во текот на целата година.

Најзначајни градинарски реони во земјава се: Струмичко-Радовишкиот, Гевгелиско-Валандовскиот, Кочанскиот, Скопскиот и Кумановскиот регион.

Доматот (*Lycopersicon Esculentum L.*) ѝ припаѓа на фамилијата ***Solanaceae***, род ***Solanum***, односно ***Lycopersicon***. Доматите потекнуваат од Јужна Америка, каде што поинтензивно почнале да се култивираат пред околу 200 години, претежно во домашните градини. Во колонијална Америка (1620-1763), поради формата на листовите, луѓето сметале дека домотот е отровен и го одгледувале само како орнаментално растение, наречено „љубовно јаболко“. Верувањата оделе до таа крајност што се сметало дека, доколку некој го изеде плодот, веднаш ќе умре. Во 1782 година Томас Џеферсон почнал да ги одгледува доматите во својата градина, а во 1806 година почнале да ги служат и на претседателските вечери. Неговите ќерки оставиле голем број рецепти за приготвување на доматите, но дури по еден век домотот го нашол своето место во готварските книги на Американците, со напомена дека треба да се готви најмалку три часа за да го изгуби горчливиот вкус.

Доматите во Европа се донесени во XV век. Најпрво биле одгледувани во Шпанија и во Португалија како декоративни растенија, но набргу биле забележани нивните благопријатни својства при консумацијата на плодовите, па почнале да се користат и како лек за подобрување на видот и против стомачни заболувања. Поголемо значење, од аспект на производството, доматите добиваат дури во деветнаесеттиот век. Како храна, доматите во Европа се пробивале сè до Првата светска војна. Така, дури по четириесеттите години од XIX век, најпрво Франција го прифатила домотот како зеленчукова култура, а

потоа и Англија, Австроунгарија, Германија и останатите земји. Во Република Македонија доматиите почнале да се одгледуваат дури по Втората светска војна (Туцаров Т., 1990; Алаџајков Л., 1963).

Од биолошка гледна точка, доматиот се смета за овошје, бидејќи неговиот плод е овариум, но поради начинот на подготвување и консумирање, се смета за зеленчук.

Во светот постојат околу 4.000 сорти на домати со најразлична големина. Најмалите „*Lucopersicon pimpinifolium*“, кои се со големина на зрно грашок, и најголемите од родот „*Panderosa*“ со тежина на плодот од околу три килограми.

Во Република Македонија најзастапени сорти меѓу производителите се: „беле“, „пунк рајп“, „новосадски јабучар“, „воловско срце“, „магнус“, „балка“, „лука“, „балкан“, „туркеса“, „лидо“, „луси“, „кармело“, „домбо“, „гранада“, „триумф“, „руџерс“, „сен пиер“, „белтона“, „домбито“, „дуго“, „кориндо“, „солара“, „онис“ и други (Туцаров Т., 1990).

Од 1997 до 2000 година производството на домати во Република Македонија бележи благ пораст со принос од 16.776 kg/ha до 19.866 kg/ha. Потоа, во 2001 и 2002 година се забележува намалување на приносот до 17.185 kg/ha, за во 2003 година повторно да се забележи зголемување на порастот до 20.396 kg/ha. Највисок принос во периодот од 1997 до 2007 година е забележан во 2006 година од 25.237 kg/ha (Графикон 1).

Во 2007 година површините под домати во Република Македонија изнесуваа околу 5.408 ha, со просечен принос од околу 21.979 kg/ha, а во 2008, 5.377 ha со принос од 22.868 kg/ha. (Статистика на Република Македонија за 2007 и 2008 год.). Притоа, само една третина од производството е наменето за консумација, додека останатите се наменети за извоз и како основна сировина во конзервната индустрија.

Поради големото стопанско значење што го има оваа култура за нашава земја, доматиот е во центарот на интересирањата на бројни научници, кои се трудат да го заштитат и издигнат на повисоко ниво неговото производство и квалитет.

Доматот е домаќин на голем број патогени од царството на вируси, габи и бактерии, а го напаѓаат и голем број инсекти и нематоди.

Од вирусните заболувања кои го напаѓаат домотот, најзначајни се: „вирусот на бронзената некроза на домотот“ („*Tomato spotted wilt virus*“), „вирусот на мозаикот на краставицата“ („*Cucumber mosaic virus*“), „вирусот на мозаикот на луцерката“ („*Alfalfa mosaic virus*“), „вирусот на мозаикот на тутунот“ („*Tobacco mosaic tobamovirus*“), „вирусот на мозаикот на компирот“ („*Potato mosaic virus*“), „вирусот на цртовидниот мозаик на компирот“ („*Potato Y virus*“), „вирусот на црната прстенеста пегавост на домотот“ („*Tomato black ring virus*“), „вирусот на безсеменоста на домотот“ („*Tomato aspermy virus*“), фитоплазмата „столбур“ („*Stolbur disease*“) и др.

Присутни, а наедно и најзначајни заболувања од габна природа кај нас, се: „сивата плесен“ („*Botrytis cinerea*“), „пламеницата“ („*Phytophthora infestans*“), „вертицилозното венеење“ („*Verticilium albo-atrum*“), „фузариозното венеење“ („*Fusarium oxysporum*“) и причинителот на гнилеж кај повеќе градинарски растенија – „*Rhizoctonia solani*“.

Бактериските заболувања, пак, како причинители на болести кај домотот, се познати од поодамна и се проучувани насекаде каде што се одгледува оваа култура. Како економски најзначајни заболувања кај нас се идентификувани: *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Mitrev et al., 2000), *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Митрев С. и Пејчиновски Ф., 1999), *Pseudomonas viridiflava* (Mitrev S., 1996), *Pantoea agglomerans* (Митрев и сор., 2007), *Pseudomonas* spp. (Митрев С. и сор., 2007), *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Mitrev S. & Kovacevik B., 2006), *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Митрев С., 1995) и *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Брсаковски В., 1994). Меѓутоа, тоа не значи дека домотот во Република Македонија не страда и од други, економски значајни видови бактерии.

Во 2005 година внимание привлече една појава која се манифестира во вид на некроза на стеблената срж кај домотот. Појавата за прв пат е забележана во пластеничкото производство на домот во околината на Струмица. Во Република Македонија досега не се среќаваат податоци за присуството на ваков вид заболување, но во светски рамки постојат многу исцрпни податоци. Оваа појава се среќава

речиси на сите континенти и може да биде предизвикана од повеќе различни причинители.

Симптомот некроза на стеблената срж кај домотот во Република Македонија најверојатно бил присутен и забележан и порано, но никој досега не му посветил доволно внимание и не го проучил.

2. ПРЕГЛЕД НА ЛИТЕРАТУРА

Бактериските заболувања кај домотот се предмет на истражувања и проучувања од страна на голем број научни работници насекаде во светот каде што домотот има поголемо економско значење. Идентификацијата на видовите и расите бактерии што ги причинуваат заболувањата и испитувањето на нивните особини, се врши со цел за нивно поефикасно сузбивање, но и за нивно искористување во областа на индустријата, медицината, биолошката заштита, нанотехнологијата и сл.

Појавата на некроза на стеблото од домотот (***Tomato Pith Necrosis – TPN***) е позната насекаде во светот. Денес постојат податоци за нејзино присуство во: Англија (Scarlett et al., 1978), Италија (V. Cattara et al., 2000), Аргентина (Alippi et al., 2003), Грција (Aliviazatos, 1984), Канада (Dhvanthari B.N., 1990), Турција (Basim H. et al., 2005), Шпанија (Lopez et al., 1994), Португалија (Moura et al., 2005), Саудиска Арабија (Molan Y. et al., 2007), Мексико (Rodrigues-Alvarado et al. 2002), Франција (Sutra et al., 1997), Русија (Kondratenko E.V. et al., 1994), Белорусија (Popkova & Nosova, 1991), Египет (Abada E. A., 2006), Индија (Pandey & Palni, 1998), Флорида (Jones J.B. et al., 1983), а според базата на податоци од CABI, болеста уште е присутна и во Бугарија, Романија, Ерменија, Латвија и на други места.

На територијата на поранешна Југославија, симптоми на некроза на стеблото од домотот за прв пат се забележани во 1971 година од страна на Арсенијевиќ, кој потоа во 1978 година ја наведува бактеријата *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* како причинител на оваа појава. Во 1988, Mijatović et al., исто така, ја забележува оваа појава и доаѓа до заклучок дека причинителите на ова заболување му припаѓаат на родот *Pseudomonas*. Шест години подоцна, во 1994, Арсенијевиќ повторно ја забележува и ја опишува оваа појава, потврдувајќи дека причинителите се од родот *Pseudomonas*.

Некрозата на стеблената срж кај домотот може да биде предизвикана од неколку видови бактерии, и тоа: ***Clavibacter michiganense*** subsp. ***michiganense*** (Smith 1910) Davis, ***Pseudomonas corrugata*** (Scarlett et al., 1978), ***Pseudomonas mediterranea*** (Cattara et al.,

2002), *Pseudomonas viridiflava* (Goumas et al., 1987), *Pseudomonas fluorescens* (Iacobellis et al., 2002), *Pseudomonas cichorii* (Wilkie and Dye, 1974; Alivizatos, 1986; Bradbury, 1981), како и од некои флуоресцентни *Pseudomonas spp.* блиски до *Pseudomonas corrugata* (Cattara et al., 1997; Sutra et al., 1997; Aliviazartos, 1984; и Dhvanthari, 1990). Повеќето од овие бактерии, како *Pseudomonas viridiflava*, *Pseudomonas fluorescens* и *Pseudomonas cichorii*, се познати како паразити на слабост. Меѓу видовите кои се карактеризираат со присуство на цитохром оксидаза, односно оксидазно позитивни видови бактерии, најпроучена е *P. fluorescens*, за која е направено комплетно секвенционирање на геномот. Сознанијата за нивната употреба во биотехнологијата, посебно во областа на биоремедијацијата (Kuiper et al., 2004), биолошката контрола (Mark et al., 2006) и биопластиката, (Olivera et al., 2001), сè повеќе се прошируваат и тие полка го заземаат своето место во индустријата. За разлика од нив, многу малку податоци има за оксидазно позитивните *P. cichorii*, *P. corrugata* и *P. mediterranea*, за кои сè уште нема направено секвенционирање на геномот. Во приоритетната листа на микроорганизми, составена во 2006 година од страна на Американското здружение на фитопатолози – APS (American Phytopathological Society), бактеријата *P. corrugata* припаѓа во групата на високо приоритетни микроорганизми за кои е потребно итно секвенционирање на геномот. Освен гореспоменатите грам-негативни фитопатогени бактерии, некроза на стеблената срж кај домотот предизвикува и грам-позитивната фитопатогена бактерија *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. При поволни услови, оваа бактерија може да предизвика големи штети од 32-96,6% (Izrailskij, 1960). Може да се пренесе преку семето, при што само 1% заразено семе може да предизвика зараза кај растенијата од 100%. Токму поради големата патогеност, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* насекаде во светот е прогласена за карантинска бактерија. Освен домотот, може да ја зарази и пиперката. Паразитот ги напаѓа спроводните садови, поради што растението вее. На заболеното стебло, под притисок се забележува бактериски ексудат, а многу често и појава на рани, поради што болеста го добила називот „рак“ на домотот и пиперката.

Првите податоци за појава на некроза на стеблената срж кај домотот датираат од 1970 година од Англија. Нешто подоцна во 1978 год. фитопатолозите Roberts и Scarlett од стеблата на заболени растенија на домати одгледувани во оранжерији го изолирале причинителот на ова заболување и го идентификувале како *Pseudomonas corrugata*. По десет години, во 1988 год. оваа бактерија е изолирана и од растенија на пиперка, со симптоми на некроза на стеблената срж (Lopez et al., 1988). Утврдено е дека бактеријата предизвикува симптоми на некроза на стеблената срж кај хризантемата (Fiori M., 1992) и гераниумот (Magyarosy & Buchanan, 1995). Освен од домати одгледувани во заштитени простори, *P. corrugata* е изолирана и од домати со симптоми на TPN одгледувани на отворено (CABI, 2006). Изолирана е и од ризосферата и коренот на незаболени растенија, како на пример, од главичка на брокула (Padaga et al., 2000), од корен на канола (Fernando et al., 2005), од ризосферата на краставица (Paulitz et al., 1992), како ендифит кај виновата лоза (Bell et al., 1995), како ендифит од коренот на луцерка (Lukezic, 1979), од 'ртулец на грав (Bennik et al., 1998), кртоли компир (Garbeva et al., 2001), зрна ориз (Cottyn et al., 1996), јагода (Tranprasert & Reed, 1997), од ризосферата на растенија чај (Pandey et al., 2000), од ризосферата на житарки (Ryder и Borret, 1991) и др. Освен од растенија *P. corrugata* е изолирана и од почва (Achouak et al., 2000; Cattara et al., 1997; Kovacevich и Ryder, 1991; Pandey et al., 2001; Ryder & Rovira, 1993; Schisler & Slininger, 1994; Scortichini, 1989 и Walker et al., 2000) и вода (Scarlett et al., 1978).

Тоа е почвена бактерија која егзистира во површинскиот слој на почвата како сапрофит. Но, при поволни услови, бактеријата со помош на капките од дожд, водата за наводнување или, пак, човекот при изведувањето на агротехничките мерки, може да дојде во контакт со растението и да навлезе во него, најчесто преку раничките формирани во пазувите на листот или, пак, преку некои други повреди. Заразата се извршува само кога растенијата се оросени. Тогаш капките роса најдолго време се задржуваат во пазувите на листовите каде што навлегува бактеријата. Оттука, таа навлегува во срцевината на стеблото. Токму овде, каде што бактеријата навлегува, на растението се формираат

кафеави дамки, на кои понекогаш може да се забележат и жолтеникави капки од бактериски ескудат. При отстранување на листот, се забележува покафеава боја на спроводните садови и на срцевината. Од стеблото, патогенот навлегува во срцевината на лисните дршки, поради што листовите почнуваат да пожолтуваат. Со напредување на болеста, по должината на стеблото се формираат кафеави пукнатини долги и до 30-40 cm. Срцевината на стеблото омекнува, се разводнува и на крајот исчезнува.

Оптималната температура за развој изнесува од 26 – 28 °C. Намалувањето на температурата во утринските часови и росата, позитивно влијаат врз развојот на болеста. Порастот на температурата во попладневните часови овозможува размножување на бактеријата и нејзино брзо ширење во растенијата (Scarlett et al., 1978).

Сè до 2000 година се сметало дека *P. corrugata* не може да навлезе во соцветието и да го зарази семето, но во 2000 год. Cirvilleri et al., употребил биолуминисцентен фенотип од патогена бактерија на *P. corrugata* и со помош на lux – транспосон Tn 4431 го креирал мутантот 4.3t lux18, со цел да го следи прогресот на бактеријата, внатрешната инфекција, како и преживувањето на или во семето и во плевелната вегетација, пред појавата на видливи надворешни симптоми. Врз основа на овие истражувања, дошол до заклучок дека бактеријата може да изврши површинска зараза на семето и да се пренесе преку него.

Anita Pandey со соработниците во 1998 година за прв пат ја идентификувала *P. corrugata* во Аргентина и во Јужна Америка. Во 1999 година ја испитувала способноста на *P. corrugata* да го подобри растот и приносот на растенијата *Amaranthus paniculatus* и *Elusine coracana* и дошла до заклучок дека главна улога за манифестирање на ова својство има компатибилноста меѓу растението и микроорганизмот, како и регионалното потекло на бактеријата. Истата авторка, во 2002 година, ја испитувала способноста на *Pseudomonas corrugata* да го претвори трикалциумфосфатот од цврста во течна состојба (како што го користат растенијата) во различен температурен ранг и дошла до заклучок дека најголемо количество калциумфосфат било претворено во течна

состојба на температура од + 21°C, но и дека бактеријата раствора повеќе фосфат на + 4 °C отколку на + 28 °C (Pandey et al., 2002).

Бактериите кои предизвикуваат некроза на стеблената срж кај домотот ги проучувал и аргентинскиот фитопатолог Anita Alippi. Како причинители на TPN во Аргентина, таа ги идентификувала *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas viridiflava* и *Pseudomonas* spp. (Alippi et al., 1993). Врз основа на фенотипските карактеристики, толерантноста на бакар и антибиотици, ELISA, патогеноста, DNA и RFLP анализите на фрагментот 16SrRNA, Alippi et al., потврдува дека постои голема хетерогеност помеѓу расите кои предизвикуваат TPN. Истата авторка, во 2003 година, за прв пат објавила дека *P. viridiflava* може да предизвика TPN кај пиперката (Alippi et al., 2003) и дека сите испитувани изолати од *P. corrugata* со потекло од Аргентина се отпорни на бакар, најверојатно поради големата употреба на бакарот во приоизводството на градинарски растенија од страна на производителите, со цел да ги контролираат габичните заболувања (Alippi et al., 2003). Генетските истражувања што ги направила, покажале дека постои сродност помеѓу изолатите од ист регион. Така, изолатите од Франција, Шпанија, Англија и Турција припаѓале на групата А, додека изолатите од Аргентина на групите В и С, при што не забележала никаква разлика кај изолатите кои се изолирани од различни култури (домат и пиперка) (Alippi et al., 2003).

Во Турција, оваа појава за прв пат била забележана во 1990 година, кога Demir G., за прв пат го објавува присуството на *P. corrugata* во оваа земја. Оттогаш до денес, појавата на TPN во Турција ја проучувале голем број истражувачи: Aysan, 2001; Ustin & Saygili, 2001; Saygili 2004 и 2005; Sahin et al., 2004; Basim et al., 2005.

Сè до 2005 година, *P. viridiflava* се сметала за најраспространета бактерија во Турција, која предизвикува TPN. Во 2005 година Basim et al., за прв пат го објавува присуството на *P. mediterranea*, а во 2006, Saygili et al., го евидентирал присуството на седум различни видови бактерии од родот *Pseudomonas*, кои причинуваат TPN: *P. fluorescens*, *P. mediteranea*, *P. viridiflava*, *P. cichorii*, *P. corrugata* и *Pseudomonas* spp. Тој за прв пат објавува дека овие бактерии можат да се определат не само врз основа на нивните биохемиски, генетски и серолошки карактеристики, туку и врз

основа на морфолошките промени што ги предизвикуваат кај растението, односно разликите во видливите симптоми што ги предизвикуваат:

Pseudomonas viridiflava предизвикува венење и пожолтување на растението во целост, кафеаво-црни дамки по стеблото и рак на петиолите. Внатрешните симптоми се манифестираат во вид на добивање кафеава боја и колапс на сржта и обезбојување на васкуларното ткиво. Од сите бактерии кои предизвикуваат TPN, единствено *P. viridiflava* предизвикува симптоми на плодот кај домотот во вид на кружни црни дамки и омекнување на ткивото околу нив.

Pseudomonas cichorii, исто така, се карактеризира со венење на растението во целост, но предизвикува и хлороза на младите ливчиња, крупни кафеаво-црни дамки на нодусите на стеблото и на местото каде што растат гранките, така што изгледа како гранката да излегува од дамката. Пожолтување, а потоа и кафеавост на сржта, дисколорација на васкуларното ткиво, но без симптоми на плодот.

Симптомите што ги предизвикува ***Pseudomonas fluorescens*** се пожолтување и венење на долните листови, кое полесно се проширува и на горните листови, мали темнокафеави дамки на стеблото и кафеавост на сржта, со отсуство на симптоми на плодот.

Pseudomonas corrugata и ***Pseudomonas mediterranea***, предизвикуваат пожолтување на горните листови, сивокафеави лезии на главното стебло, пукање и појава на адвентивни коренчиња на местото на пукнатината. И овие две бактерии, исто така, не предизвикуваат симптоми на плодот. Внатрешните симптоми се во вид на пожолтување, кафеавост, појава на празнини и колапс на сржта на стеблото, како и обезбојување на васкуларното ткиво.

Анализата на масните киселини покажала голема сличност меѓу овие седум видови бактерии кои предизвикуваат некроза на стеблената срж, поради што авторот смета дека идентификацијата треба да се базира на LOPAT тестовите и PCR анализи (Saygili et al., 2006).

Врз основа на сите досегашни истражувања, можеме да ги изнесеме основните карактеристики на *P. corrugata*, а тоа се: грам-негативна бактерија со неколку флагели на двата пола (Scarlet et al.,

1978); оксидазно позитивна, аеробна, нефлуоресцентна и аспорогена бактерија; реакциите на дехидролиза на аргинин и хиперсензибилност на листови од тутун се варијабилни (Sutra et al., 1997; Cattara et al., 2002). Во Италија, Cattara et al., (2002) испитувала околу 100 изолати на *P. corrugata* од различни подрачја и заклучила дека по 15 дена повеќето видови (околу 80%) вршат дехидролиза на аргининот, а само 20% предизвикуваат хиперсензибилна реакција на листови од тутун. Бактеријата, најчесто создава набрани, поретко мазни колонии со жолт или кафеав дифузен пигмент на подлога YPGA (Yast Peptone Glucose Agar) или NDA (Nutrient Dextrose Agar) (Sutra et al., 1997; Cattara et al., 2002). Денес се знае дека колониите со мазна површина, всушност, претставуваат морфолошки мутанти на колониите од збрчан тип. Тие, најчесто, се формираат во текот на култивирањето (перманентното одгледување на вештачка хранлива подлога), или реизолацијата од инокулирана почва. Кај ваквите мутанти, профилот на масните киселини, ензимската активност, како што е неспособноста да го хидролизираат казеинот, желатинот, лецитинот и Твин 80, како и асимилацијата на различни јаглеродни хидрати, се разликуваат во однос на родителската клетка (Barnett et al., 1999; Lukezic et al., 1979; Siverio et al., 1993, 1996; Triverdi & Sa, 2008).

Друга важна карактеристика на *P. corrugata* е неспособноста да предизвика гнилеж на резанки од компир и неспособноста да образува леван. Може да изврши редукција на нитрати во нитрити, да се развива на + 4 °C, да го разлага желатинот и да произведува poly- β -hydroxybutyrate (PBH). Може да ги користи следниве соединенија: mannitol, trehalose, saccharose, D-arabinose, L-arabinose, D-xylose, N-acetylglucosamine, glucosamine, inositol, D-arabitol, L-arginine, L-aspartate, betaine, caprate, *n*-caproate, caprylate, citrate, D-fructose, fumarate, D-galactose, D-glucose, gluconate, L-glutamate, glutarate, glycerol, heptanoate, D,L-lactate, L-leucine, L-malate, malonate, D-mannose, pelargonate, ribose, threalose, trigonelline, L-tyrosine, L-(+)-tartarat, 2-aminobenzoate, *n*-valerate, isovalerate, isobutyrate, D,L-3-hydroxybutyrate, *p*-hydroxybenzoate, L-isoleucine, 2-ketogluconate, 2-ketoglutarat, mesaconate, itaconate, citraconate, laevulinate, succinate, L-tryptophan, L-valine, L-leucine, L-phenylalanine, L-citruline, L-

alanine, L-phenylalanine, D-alanine, histamine, L-histidine, spermine, trigonelline, DL-kunurenine, ethanolamine, amylamine, DL-5-aminovalerate, L-proline, propionate, DL-4-aminobutyrate, diaminobutane, sarcosine, L-serine, spermine и други (Sutra et al., 1997).

Не врши хидролиза на скроб и ескулин, ниту, пак, ги користи следниве соединенија: acetamide, adipate, adonitol, 2-aminobenzoate, 3-aminobenzoate, 4-aminobenzoate, D,L-2-aminobutyrate, amygdaline, D-arabinose, L-arabitol, arbutine, azelate, benzoate, benzylamine, butylamine, D-cellobiose, L-citrulline, creatine, L-cysteine, dulcitol, ethylamine, erythritol, D-fucose, L-fucose, D-gentobiose, glycine, glycogen, glucolate, o-hydroxybenzoate, m-hydroxybenzoate, inulin, itaconate, maleate, maltose, D-mandelate, L-mandelate, D-melezitose, D-melibiose, mesaconate, L-methionate, methyl-D-glucoside, methyl-D-mannoside, methylxyloside, DL-norvaline, oxalate, phenylacetate, phthalate, isophthalate, *ter*-phthalate, pimelate, D-raffinose, rhamnose, salicin, sebacate, sorbitol, suberate, L-tartarate, D-tagatose, L-threonine, tryptamine, D-tryptophan, L-tryptophan, D-turanose, urea, xylitol и L-xylose (Sutra et al., 1997).

Реакцијата со следниве соединенија е варијабилна: DL-3-aminobutyrate, amylamine, butyrate, isobutyrate, citraconate, ethanolamine, DL-glucerate, histamine, 2-ketogluconate, L-lysine, D-lyxose, D-malate, L-norleucine, L-ornithine, isovalerate, D-tartarate, *meso*-tartarate и pyruvate (Sutra et al., 1997).

Содржината на базите гванин и цитозин во дезоксирибонуклеинската киселина на *P. corrugata* изнесува од 50,4 до 60,8% (Sutra et al., 1997).

Врз основа на фенотипските карактеристики, ѝ припаѓа на групата нефлуоресцентни бактерии од родот *Pseudomonas* (Scarlet et al., 1978). Palleroni (1984) ја класифицира *P. corrugata* во петтата група од родот *Pseudomonas*, меѓу нефлуоресцентните бактерии, кои денес се класифицирани во родовите *Pseudomonas*, *Burkholderia* и *Acidovorax*. Врз основа на DNA-rRNA хибридизацијата, De Vos et al. (1985) ја вклучува во групата на *Pseudomonas fluorescens* rRNA помеѓу флуоресцентните *Pseudomonas* видови. До сличен заклучок дошол и Stead (1992), кој вршел класификација на фитопатогените и другите видови бактерии од

родот *Pseudomonas* врз основа на нивниот профил од масни киселини и ја сместил *P. corrugata* во групата 1, која содржи шест подгрупи. Подгрупата 1a кореспондира на флуоресцентните *Pseudomonas* видови, а подгрупата 1b на *P. corrugata*. Во 1997 година Sutra et al. вршел споредба на *P. corrugata* и другите *Pseudomonas* флуоресцентни видови, изолирани од растенија на домати со симптоми на некроза на стеблената срж (**FPTPN** - *Fluorescent Pseudomonas Tomato Pith Necrosis*) и геномската сличност помеѓу видовите од *P. corrugata* со потекло од разни региони. Во своите истражувања Sutra et al. дошол до заклучок дека *P. corrugata*, според ЛОПАТ шемата ѝ припаѓа на групата Va која вклучува сапрофитни и паразитни флуоресцентни *Pseudomonas* видови, како што се *P. fluorescens*, *P. putida* и *P. aeruginosa*. Исто така, тој заклучил дека различните раси од *P. corrugata* имаат разлики во фенотипските карактеристики и, како резултат на тие истражувања, дошол до заклучок дека *P. corrugata* е многу блиска до FPTPN видовите, односно многу поблиска до флуоресцентните *Pseudomonas* видови, отколку до нефлуоресцентните *Pseudomonas* sp., *Acidovorax* sp., *Herbaspirillum* sp. и *Burkholderia* sp..

Според добиените резултати од DNA-rRNA хибридизацијата, Sutra et al. (1997) смета дека *P. corrugata* ѝ припаѓа на суперфамилијата 2 и на rRNA гранката на *P. fluorescens*. Но, бидејќи е нефлуоресцентна, може да се смета за исклучок од оваа гранка. До истиот заклучок дошол и Stead (1992) врз основа на хемотаксономските анализи кои ги направил на квиноните и масните киселини кај *P. corrugata*.

Врз основа на сите направени испитувања, Sutra et al. (1997) смета дека видот *P. corrugata* може да се подели на два подвида - 1a и 1b, врз основа на следниве три биохемиски карактеристики: асимилација на *meso-tartarate*, *isobutyrate* и *histamine* (Sutra et al., 1997). До слични сознанија доаѓа и Catara et al. (2002) во Италија. Врз основа на испитаните 55 изолати од *P. corrugata*, со потекло од јужна Италија и 23 изолати од други земји, заклучила дека постои голема хетерогеност помеѓу нив во однос на фенотипските и серолошките карактеристики, како и протеинскиот профил на бактеријата. Врз основа на користењето на 2-ketogluconate, *meso-tartarate*, *histamine*, DL-glycerate и тестот за

хиперсензибилност на листови од тутун, сите изолати биле поделени во три групи. Серолошките карактеристики биле различни дури и кај бактериите изолирани од истата оранжерија. Вкупно, биле забележани петнаесет липополисахариди. Врз основа на протеинскиот профил, изолатите биле поделени во две групи. Во 2002 година истиот автор, врз основа на опсежни генетски и биохемиски истражувања, го одвојува видот *Pseudomonas mediterranea* од видот *Pseudomonas corrugata*. Зборот “*mediterranea*” потекнува од италијанскиот збор “*mediterranean*”, бидејќи најчесто овој вид бактерија се среќава во медитеранските земји. Тоа е грам-негативна бактерија која не создава спори. Овој вид ги има истите генерални карактеристики како и *P. corrugata*. Колониите на YPGA подлога можат да бидат набрани или мазни и произведуваат жолто-кафеав пигмент. Бактериската клетка е подвижна со по неколку флагели на двата пола, аеробна, нефлуоресцентна на подлога King B, оксидазно позитивна, не формира леван, не е пектолитички активна, но врши редукција на нитрати во нитрити. Повеќето бактерии, по 15 дена вршат дехидролиза на аргининот, а реакцијата за хиперсензибилност на листови од тутун е ретка. Хидролизата на Tween 80 и желатин е варијабилна. Киселини произведува од сахароза и манитол, но не од сорбитол и еритритол.

Во однос на користењето јаглени хидрати, разликата помеѓу *P. mediterranea* и *P. corrugata* е во тоа што *P. mediterranea* ги користи хистаминот, 2-кетоглуконатот и месо-тартаратот, за разлика од *P. corrugata* која што не ги користи овие соединенија. *P. mediterranea* го користи D,L-glycerate-от, а не го користи D-tartrate-от, додека користењето на овие соединенија од страна на *P. corrugata* е варијабилно (Cattara et al., 2002). Cattara et al., заедно со своите соработници, во 1999 година за прв пат го развила протоколот за директна детекција на бактериите *P. corrugata* и *P. mediterranea* со помош на мултиплекс PCR амплификација (Cattara et al., 2000). *P. mediterranea* може да биде јасно одвоена од *P. corrugata* со помош на 16SrDNA анализа, REP-PCR, BOX-PCR и random-primed PCR (Cattara et al., 2000). Прајмерите од типот I: PC 5/1 (5'-CACAGGACAACATGTCCAC-3') и PC5/2 (5'-CAGGCGCTTTCTGGAACATG-3') и типот II PC 1/1(5'-

GATATGAGCCAGGTCTTCG-3') и PC 1/2 (5'-GCTCAAGCGCGACTTCAG-3'), дизајнирани од Cattara et al., (2000), овозможуваат PCR идентификација и детекција во исто време и на *P. corrugata* и на *P. mediterranea*, со тоа што првата го формира бандот на 1.100 bp, а втората на 600 bp (Cattara et al., 2000). Засега, *P. mediterranea* е изолирана како причинител на некроза на стеблената срж кај домотот и пиперката во Италија (Cattara et al., 2000), а само кај домот во Шпанија (Lopez et al., 1994), Франција (Cattara et al., 2002), Португалија (Moura et al., 2005) и во Турција (Basim et al., 2005; Sahin et al., 2005).

За употребата на *P. medditeranea* нема многу податоци, бидејќи е релативно нова бактерија, но за *P. corrugata* постојат бројни сознанија. Меѓутоа, имајќи ја предвид големата сличност помеѓу нив, како и фактот дека *P. mediterranea* е одвоена од *P. corrugata* во 2002 година, голема е веројатноста дека некои од овие сознанија би можеле да бидат својствени и за *P. mediterranea*.

Способноста на *Pseudomonas corrugata* да произведува различни соединенија, ја проучувале повеќе научници. Така, Corsaro et al. (2004), со помош на масна спектрометрија, докажал дека *Pseudomonas corrugata* може да произведе липид А, кој е многу корисен биосурфактант. Fett et al. (1996) ги проучувал ексополисахаридите што ги произведува оваа бактерија. Структурата, конформацијата и биолошката активност на липодепсипептидот кормицин А од *P. corrugata*, во 2004 година го проучувал Scaloni со соработниците. Ова соединение им припаѓа на нонапептодните лактони и претставува силен инхибитор на *Bacillus megaterium* и *Rhodotorula pilimanae*, многу повеќе отколку липодепсипептидите што ги произведуваат другите видови од родот *Pseudomonas*. Проучени се и корпептините (Emanuele M.C. et al., 1998), липопептидот коругатин (Risse D. et al., 1998) и биоразградувачкиот полимер - полихидроксиалканоат (Daniel K. et al., 2005), со голем потенцијал на искористеност во индустријата и во медицината (Snell K. D. et al., 2002).

Постојат податоци дека *P. corrugata* е ефикасен агент во биолошката контрола на повеќе фитопатогени бактерии и габи. Врз основа на истражувањата на Bell et al. (1995), Chun & Leary (1989) и

Cirvilleri et al. (2001), може да се заклучи дека *P. corrugata* во *in vitro* услови го инхибира порастот на голем број видови бактерии од родот *Bacillus*, потоа *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*, *Brenneria quercina*, *Burkholderia cepacia*, *P. syringae* pv. *pisi*, *P. syringae* pv. *tomato* и *Agrobacterium tumefaciens*. Но, освен бактерии, како што спомнавме погоре, таа може да го инхибира порастот и спорулацијата и на повеќе економски значајни габи, како што се *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (Ryder & Rovira, 1993; Ryder et al., 1999), *Pythium aphanidermatum* (Zhou & Paulitz, 1993, 1994), *Gibberella pulicaris* (Schisler & Slilinger, 1994), *Botrytis cinerea* и *Penicillium digitatum* (Cirvilleri et al., 2000), како и *Sclerotinia sclerotiorum* (Fernando et al., 2005). Денес во САД постојат два патента за употребата на *P. corrugata*, како агент во биолошката контрола (Chun, 2000, патент бр. 6156560 и Chun, 2002, патент бр. 6383798). Ваквата способност, најверојатно се должи на способноста на бактеријата да произведува липодепсипептиди – корпетин А и корпетин Б (Emanuele et al., 1998; Scaloni et al., 2004), но и други соединенија, како што се хидрогенцијанид (Ramette et al., 2003), 2,4-диацетилфлуороглуцинол и пиrolнитрин (Garbeva et al., 2001).

Во 1998 година, Dumenyo et al., а подоцна и Elasri et al. (2001), докажуваат дека *P. corrugata* може да произведува N-acyl homoserine лактон, одговорен за вируленцијата и хиперсензибилната активност на бактеријата. Изолатите добиени од загадени подрачја покажале разградувачка активност, па затоа, *P. corrugata* се препорачува и како биоремедијатор. Таа може да ги разгради ароматичните хидрокарбони: толуен, етилбензен m-ксилен, o-ксилен, нафтаген (Gulensoy & Alvarez, 1999) како и фенол p-kresol (Heinary et al., 2000), компонентите од горивата (Baryshnikova et al., 2001) и 4-хлороанилин (Radianingtyas et al., 2003).

Друга интересна употреба на *P. corrugata* и *P. mediterranea* се должи на нивната способност да произведуваат mcl-PHAs (medium-chain-length polyhydroxyalkanoates) (Solaiman et al., 2005). При недостиг на храна, PHAs синтетизираат голем број бактерии и затоа се верува дека PHAs играат важна улога во нивниот опстанок, посебно во средини каде што изворите на јаглерод и на енергија се ограничени, како што се

условите во почвата и ризосферата (Kadouri et al., 2005). Откако еднаш ќе се изолираат од клетката PHAs, ги имаат истите карактеристики како и синтетичките полиестри. Тие се биодеградибилни и затоа имаат голема употреба во индустријата и во медицината (Madison & Huisman, 1999). *P. corrugata* и *P. mediterranea* имаат посебно значење во ова својство на бактериите, бидејќи тие можат да произведуваат mcl-PHAs не само од чисти извори, како што се долгосинџерестите масни киселини кои се многу скапи, туку и од економски поисплатливи извори, како што се биодизелот (Ashby et al., 2003), глицеролот (Ashby et al., 2005) и сојата (Solaiman et al., 2006).

Во последниве години, бактеријата ***Pseudomonas viridiflava*** (Burkholder, 1930) се јавува како многу чест патоген на голем број растенија, како што се: грав, грашок, домати, тиква, кајсија, праска, актинидија, како и на голем број украсни цветни растенија, па и плевели (Arsenijević, 1988).

Не се смета за вистински паразит, бидејќи е со релативно послаба патогеност, односно по почетните симптоми, обично не предизвикува изумирање на растенијата и ширење на симптомите. Се смета дека растенијата ги паразитира под изразито неповолни еколошки услови, како и после примарна инфекција од страна на други паразити од родот *Pseudomonas* и *Xanthomonas*. Но, во литературата се среќаваат податоци дека некои раси од *Pseudomonas viridiflava* покажуваат особини на вистински агресивен паразит (Wilkie et al., 1973). Во Јапонија е откриен како вистински паразит на домати, одгледуван во стакларници, во текот на сезоните со пониски температури (Nishiyama et al., 1979). Истата бактерија е изолирана и во Аргентина, од стеблото на домати заболени од TPN, заедно со *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas mediterranea* и *Pseudomonas* spp. (Alippi et al., 2003).

Изгледот на колониите варира во зависност од подлогата. На месопептонска подлога NA, колониите се обично испакнати, слузести, со кремova до жолта боја, понекогаш и со темносива периферија. Забележани се и порамни матносиви колонии, кои на подлога со 5% сахароза, имаат жолта нијанса.

Врз основа на ЛОПАТ тестовите, *Pseudomonas viridiflava* ѝ припаѓа на група II, секција I од родот *Pseudomonas*, односно не создава леван, оксидаза и аргинин-дехидролаза, а предизвикува гнилеж на резанки од компир и хиперсензибилна реакција на листови од тутун.

Бактеријата е аеробна и грам-негативна. На Кинг Б подлога создава флуоресцентен жолт пигмент, а кај некои може да се забележи и сино-зелен пигмент. Не го хидролизира скробот, не врши редукција на нитратите, а врши хидролиза на желатин и ескулин. На температура од 37°C нема развој.

Од јаглените хидрати користи манитол, 2-кетоглуконат, сорбитол, месо-тартарат и D(-)-тартарат, а не ги користи гераниол, бензоат, целобиоза, трехалоза, сахароза, D-арабиноза, L-рамноза и D-аспартат.

Од останатите оксидазно негативни бактерии од родот *Pseudomonas*, се разликува по неспособноста да ја користи сахарозата и појавата на гнилеж на резанки од компир.

3. ЦЕЛ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО

Во последниве неколку години, од 2005 до 2008 година, следејќи ја здравствената состојба на градинарските култури во Струмичкиот регион, забележана е појава на некроза на стеблената срж кај домотот, со бактериска природа. Појавата е забележана во производството на домот под пластеници. Вакви симптоми се забележани и во земјите од нашето поблиско соседство, како што се Бугарија, Турција, Србија и Италија, но и насекаде во светот каде што се одгледуваат домати. Испитувањата во светски рамки покажале дека некрозата на стеблената срж кај домотот може да биде предизвикана од повеќе бактерии: *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas mediteranea*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas viridiflava* или, пак, *Pseudomonas marginalis* и *Pseudomonas cichorii*, при што во различни региони како причинители се идентификувани различни бактерии.

Податоците од истражувањата на голем број истражувачи, во чиј што центар на внимание е оваа појава, покажуваат дека најдеструктивни и економски најзначајни од бактериите причинители на TPN се: *Pseudomonas corrugata* Roberts and Scarlet et al. и *Pseudomonas mediteranea* spec. et nov. *Pseudomonas mediteranea*, во 2002 година, е издвоена од видот *Pseudomonas corrugata* како посебен вид (Cattara et al., 2002).

Погоре споменатите бактерии можат да предизвикаат големи економски загуби, доколку не се преземат навремени и соодветни агротехнички мерки.

Од сопствени истражувања и согледувања на теренот, можеме да заклучиме дека болеста „Некроза на стеблената срж кај домотот“ од година во година добива сè поголеми размери. Во Република Македонија никој досега нема работено на оваа проблематика, така што нема податоци за тоа кои се причинителите на ова заболување во наши услови. Затоа, си поставивме задача, да го направиме првиот чекор во истражувањето на природата на ова заболување, односно да направиме идентификација и детерминација на патогенот или патогените што го предизвикуваат ова заболување кај нас, а кое во светот е многу

проширено и познато под името “***Tomato Steam Necrosis-TPN***”, односно “**Некроза на стеблената срж кај домот**”.

Посебно внимание во истражувањето ќе му се посвети на утврдување на присуството на патогените бактерии *Pseudomonas corrugata* и *Pseudomonas mediteranea*, кои се присутни во земјите од соседството, поради што голема е веројатноста да бидат присутни и кај нас, како и поради симптомите кои се забележани во пластеничкото производство.

Знаејќи го точниот причинител / причинители и нивните одгледувачки, биохемиски и генетски карактеристики, превентивата како и заштитата, ќе може да се навреме спроведат со употреба на соодветни средства и методи за работа.

4. МЕТОДИ НА ИСТРАЖУВАЧКАТА РАБОТА

4.1. Општа техника користена во работата

Појдовен материјал за проучување на фитопатогените бактерии беа одбрани делови од заболени растенија на домати во заштитени услови. Материјалот во најлонски кеси е пренесен во лабораторија и веднаш е употребен.

Епруветите и петиевите кутии претходно се вриени во вода, потоа добро се миени со детергент и исплавени прво во обична, а потоа и во дестилирана вода. Сите подготвени хранливи подлоги и приборот за работа се стерилизирани во автоклав, на температура од 121 °C и притисок од 1,5 бари, во време од 15 минути.

Засејувањето на хранливите подлоги е вршено со бактериска еза.

За работа се користени бактериски колонии, стари до 24 часа. За краткотрајна употреба, одржувањето на чистите култури од бактериите е вршено со пресејување на изолатите на стандардна месопептонска хранлива подлога (NA) и инкубација во термостат на 27 °C до 24 часа, а потоа чувани во фрижидер на +4 °C до 15 дена. Сите изолати долготрајно се складирали во стерилна дестилирана вода на собна температура и на темно, како и во фрижидер на -20 °C.

Месопептонската хранлива подлога (NA) е приготвена од следниве компоненти:

Месен екстракт	1 g
Екстракт од квасец	2 g
Пептон (бактериски – 1)	5 g
NaCl	5g
Агар	15 g
Дестилирана вода	1000 ml

Подлогата е приспособена на pH 7.2 – 7.4 (Арсенијевиќ, 1988, Klement et al., 1990).

4.2. Изолирање на бактериите

4.2.1. Изолирање на бактериите од растителен материјал

Изолацијата на чисти бактериски култури е извршена од стеблената срж на заболени растенија од домати, кои покажуваа

симптоми на „**Tomato Pith Necrosis**“. Од овие растенија, се земени делови од местото на преминот на болното во здравото ткиво. Овие фрагменти од ткивото неколку минути се миени во истечна вода, сушени на филтер хартија на собна температура и мацерирани во стерилни авани со стерилна вода. Добиената суспензија е оставена да отстои петнаесетина минути на собна температура, а потоа од неа, со помош на бактериска еза, е извршено засејување на месопептонска хранлива подлога (NA) во петриевите кутии. Засеаните петриеви кутии се инкубирани во термостат на 27 °C, од 3 до 4 дена. Карактеристичните колонии се пренесувани на коса хранлива подлога NA со помош на бактериска еза и инкубирани во термостат на 27 °C во рок од 24 часа, а потоа се чувани во фрижидер на + 4 °C до нивната употреба. При испитувањата, секогаш се користени бактериски колонии стари до 24 часа.

Сите добиени изолати, како чисти култури, за понатамошните испитувања се групирани врз основа на следниве диференцијални тестови:

- Боење според грам;
- Хиперсензибилна реакција на листови од тутун (*Nicotiana tabacum*) или листови од малофа (*Pelargonium zonale*) со помош на медицински шприц;
- Создавање на леван;
- Активност на оксидаза;
- Гнилеж на кртоли од компир;
- Метаболизам на аргининот и
- Патогеност на домати.

Потоа, одделни изолати беа испитувани со BIOLOG тест и идентификувани со Polymerase chain reaction.

4.2.2. Изолирање на бактериите од почва

За изолирање на бактериите од почвата, со мали модификации е користена методата на Tuite (1969). За таа цел, репрезентативниот примерок од почвата е пресеан низ сито од 2 mm. Од пресеаната почва се земени 10 g и додадени во 200 ml дестилирана вода. Суспензијата

бавно е мешана 20 минути со магнетна мешалка и оставена да отстои околу 30 минути на собна температура. Потоа, од оваа суспензија е извршено засејување на подлога TSA и подлога YDCA во кои има додадено 75 µl cycloheximide, ampiciline и chloramphenicol (Ryder & Rovira, 1993). Петриевките се инкубирани на 27 °C и по четири дена е прегледан развојот и изгледот на колониите. Специфичните колонии се засеани на подлога NA, инкубирани на 27 °C во времетраење од 24 часа, а потоа се испитувани.

4.3. Определување на патогените одлики на испитуваните изолати

4.3.1. Проверка на патогеноста на листови од тутун (*Nicotiana tabacum*)

Проверката на патогеноста на испитуваните изолати на листови од тутун (*Nicotiana tabacum*) е извршена со инјектирање на бактериска суспензија од 10^8 - 10^9 CFU/ml во лист од тутун, во местото помеѓу два нерва, со помош на медицински шприц. Како негативна контрола е користена дестилирана вода.

Потоа, растенијата од тутун се чувани во собни услови, а хиперсензибилната реакција е отчитана по 24 часа (Lelliot & Stead, 1987).

4.3.2. Проверка на патогеноста на листови од малофа (*Pelargonium zonale*)

Проверката на патогеноста на испитуваните изолати на листови од малофа (*Pelargonium zonale*) е извршена со вбригување на бактериска суспензија од 10^8 - 10^9 CFU/ml со помош на медицински шприц, во пределот помеѓу два соседни нерва од листот. Како негативна контрола е користена дестилирана вода.

Потоа растенијата од малофа се чувани во собни услови, а хиперсензибилната реакција е отчитана по 24 часа.

4.3.3. Проверка на патогеноста на растенија од домат (*Lycopersicon esulentum*)

Проверката на патогеноста кај растенија од домат е извршена на два начина.

Првиот начин е извршен со инјектирање на 0,05 ml бактериска суспензија со концентрација од 10^8 CFU/ml, со помош на медицински шприц. Инокулацијата е извршена на растенија од домати стари две недели, и тоа со еден убод во стеблото 2 - 3 cm над почвата (Lelliot & Stead, 1987). Местото на убодот е заштитено со влажна вата и парафилм, а растенијата се покриени со најлонски ќеси во наредните 24 часа. Наредниот ден, парафилмот е изваден, а растенијата се откриени и чувани во контролирани услови, на температура од 20 °C и осветлување од 11 часа, со нормално наводнување.

Вториот начин е извршен со убод во аксилот на растенија од домати стари две недели, со 0,05 ml бактериска суспензија од 10^8 CFU/ml. Растенијата се покриени со најлонска ќеса во наредните 24 часа, а потоа се откриени и чувани во контролирани услови на температура од 20 °C и осветлување од 11 часа.

4.4. Одгледувачки одлики на изолатите

Одгледувачките одлики на добиените изолати се испитувани на неколку хранливи подлоги, кои многу често се користат во фитобактериологијата. Користени се следниве хранливи подлоги:

1. Стандардна месопептонска подлога (**NA**):

Месен екстракт	1 g
Екстракт од квасец	2 g
Пептон (бактериски – 1)	5 g
NaCl	5g
Агар	15 g
Дестилирана вода	1000 ml

Подлогата е приспособена на pH 7,2 – 7,4 (Арсенијевиќ, 1988, Klement et al., 1990).

2. Месопептонска подлога обогатена со 5% сахароза (**NAS**):

Месен екстракт	1 g
Екстракт од квасец	2 g
Пептон (бактериски-1)	5 g

Сахароза	50 g
NaCl	5 g
Агар	15 g
Дестилирана вода	1000 ml

Подлогата е приспособена на pH 7,2 – 7,4 (Арсенијевиќ, 1988, Klement et al., 1990).

3. Кингова подлога Б (**Кинг Б**):

Протеаза пептон Difko No. 3	20 g
K ₂ HPO ₄	1,5 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1,5 g
Агар	15 g
Дестилирана вода	1000 ml

Подлогата е приспособена на pH 7,4 (Арсенијевиќ, 1988, Klement et al., 1990).

4. Модифицирана подлога со екстракт од квасец и декстроза (**YDCA**):

Екстракт од квасец	10 g
Декстроза	20 g
CaCO ₃	20 g
Агар	15 g
Дестилирана вода	1000 ml

Подлогата е приспособена на pH 7,2 – 7,4 (Арсенијевиќ, 1988, Klement et al., 1990).

Користените подлоги се резлеани во стаклени колби од 150 – 200 ml и автоклавираани. Потоа, подлогите се разлеани во петриеви кутии со пречник од 9 cm и неколку часа се сушени во стерилна комора под UV светло.

Засејувањето е извршено со бактериска еза со трикратно разрежување на колониите на предметно стакло. Засеаните подлоги се чувани во термостат во текот на 3 – 4 дена при температура од 27 °C. Набљудувани се обликот на колониите, бојата, конзистенцијата,

провидноста, изгледот на рабовите, површината, големината, слузавоста и сл.

4.4.1. Боење според Грам

Боењето според Грам е испитувано на предметно стакло со 3% КОН. Се става една капка од 3% КОН, се зема полн зафат од бактериите со помош на дрвено стапче и се размачкува околу капката, а потоа се меша. Појавата на тенки растегливи конци со подигањето на стапчето е знак дека бактериите се грам – негативни, а нивното отсуство е знак дека бактериите се грам – позитивни (Lelliot & Stead, 1987).

4.4.2. Создавање на леван

Создавањето на леван е особина на бактериите да создаваат полисахарид (полифруктозид), користејќи ја сахарозата од подлогата (NAS). Изгледот на колониите се набљудува по 2 до 3 дена развој на подлога NAS (стр. 22), разлеана во петриева кутија.

Левански тип на колонии се сметаат оние кои стануваат крупни, испакнати, слузести и светкави, а по боја се бели или кремиви или, пак, некоја нијанса на кремиво-бели колонии. Оваа карактеристика се вклучува во ЛОПАТ тестовите (Арсенијевиќ, 1997; Lelliott & Stead, 1987).

4.4.3. Создавање на флуоресцентен пигмент

Флуоресценцијата претставува својство на некое тело, под влијание на светлина со одредена бранова должина, да зрачи светлина со друга помала бранова должина, и тоа само додека на неа дејствува таа светлина (Вујаклија, 1954).

За испитување на присуството на флуоресцентен пигмент е користена подлога Кинг Б (стр.22). Подлогата е разлеана во епрувети од 16 x 160 mm и стерилизирана во автоклав. По стерилизацијата, епруветите се закосени и изладени на собна температура.

Подлогата е засеана со помош на бактериска еза, според стандардна постапка, а потоа епруветите се чувани во термостат во време од 24 часа. Појавата на флуоресценција, видлива под UV светло, која многу често може да биде забележана и со голо око, укажува на позитивност на реакцијата (Lelliot & Stead, 1987).

4.4.4 Развој на соодветна температура

Користена е хранлива подлога со екстракт од квасец и неоргански соли (YS – подлога, Yast salts broth):

$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	0,5 g
K_2HPO_4	0,5 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 g
NaCl	5 g
екстракт од квасец	5 g
Дестилирана вода	1000 ml

Подлогата е приспособена на pH 7.0 – 7.2

Подлогата е разлевана во епрувети од 16 x 160 mm од по 10 ml, а потоа епруветите се стерилизирани во автоклав. Секој изолат е засеан во три повторувања. Чеповите на засеаните епрувети се обложени со алуминиумска фолија и епруветите се чувани во термостат на соодветна температура (4 °C, 37 °C или 41 °C). Заматувањето на подлогата, во споредба со незасеаната контрола, во рок од 7, или 14 дена за бактерии со слаб пораст, укажува на развој на бактеријата на дадената температура (Schaad, 1988).

4.4.5 Толерантност спрема 5% и 7% NaCl

Толерантноста спрема NaCl се испитува во течна подлога од екстракт на квасец и неоргански соли (YS – подлога), со додавање на NaCl, така што вкупната концентрација на NaCl во растворот е 5% или 7% (Арсенијевиќ, 1997). Подлогата е разлевана во епрувети од 16 x 160 ml и стерилизирана во автоклав. Засејувањето е извршено со бактериска еза според стандардна постапка и засеаните епрувети се чувани во термостат на 27 °C во рок од 14 дена. Појавата на заматување на подлогата, во спореба со негативната контрола, е знак за развој на бактериите во соодветната концентрација од NaCl и реакцијата се оценува како позитивна.

4.4.6 Хидролиза на скроб

За испитување на способноста на бактериите да вршат хидролиза на скроб е користена подлога подготвена од следниве компоненти:

Месен екстракт	1 g
Екстракт од квасец	2 g
Пептон (бактериски – 1)	5 g
NaCl	5 g
Скроб	2 g
Агар	15 g
Дестилирана вода	1000 ml

Подлогата е приспособена на pH 7.0 – 7.2

Додавањето на скробот во подлогата се врши откако претходно ќе се раствори во 10 ml дестилирана вода. Потоа, вака приготвената подлога се разлива во стаклени колби од по 100-200 ml и се стерилизира во автоклав. Стерилизираната подлога се разлива во петриеви кутии, кои откако ќе се исушат, се засејуваат со помош на бактериска еза и се инкубираат во термостат на 27 °C во рок од 2 - 4 дена. Откако ќе се забележи добар развој на колониите, тие се прелеваат со луголов јодид и се чуваат извесно време во фрижидер. Луголовиот јодид е подготвен на следниов начин:

Јод	1 g
KJ	2 g
Дестилирана вода	300 ml

Појавата на чиста зона, опкружена со црна боја околу колониите, или пак, појавата на црна боја по површината на колониите, е знак за позитивна реакција и хидролиза на скробот од страна на бактериите (Арсенијевиќ, 1988).

4.4.7 Разлагање на желатин

За испитување на способноста на бактериите да го разложуваат желатинот е користена следнава подлога:

Екстракт од квасец	3 g
Пептон (бактериски – 1)	5 g
Желатин	120 g
Дестилирана вода	1000 ml

Подлогата е приспособена на pH 7.0 – 7.2

Количество од по 10 ml подлога се разлевани во епрувети од 16 x 160 ml и стерилизирани во автоклав. Изолатите се засејувани со увод од бактериска еза во три повторувања, а како контрола е користена незасеана подлога. Епруветите се чувани во термостат на 27 °C, а резултатите се отчитувани по 3, 7, 14 и 21 ден. Пред секое отчитување, епруветите се ставани во фрижидер на 4 °C во времетраење од 30 минути. Недостигот од зацврстување на подлогата е резултат на разлагање на желатинот и реакцијата се смета за позитивна (Арсенијевиќ, 1988).

4.4.8 Создавање на амонијак

Користена е 2% пептонска вода, разлиена по 5 ml во епрувети со големина од 16 x 160 mm и стерилизирана во автоклав. Секој изолат е засеан со бактериска еза во три повторувања и епруветите два дена се чувани во термостат на 27 °C. При отчитувањето, во секоја епрувета се додавани по 5 ml неслеров реагенс. Појавата на жолто-портокалов преципитат е резултат на создавање на амонијак и реакцијата се смета за позитивна (Goodman, 1975).

4.4.9 Создавање на H₂S од пептони

Користена е следнава хранлива подлога

NH ₄ H ₂ PO ₄	0,5 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,2 g
NaCl	5 g
Екстракт од квасец	5 g
Цистеин хидролизат	0,1 g
Дестилирана вода	1000 ml

Подлогата е приспособена на pH 7.0 – 7.2

Количество од по 5 ml подлога се разлевани во епрувети со големина од 16 x 160 mm и истите се стерилизирани во автоклав. Потоа, ленти од филтер хартија со широчина од 5 mm и должина околу 12 cm се потопени во 5% оловоацетат и сушени на собна температура.

Исушените ленти се ставени во петриева кутија со пречник од 15 cm и стерилизирани во автоклав.

Секој изолат е засеан во три повторувања со помош на бактериска еза и во секоја епрувета е ставана по една лента, така што растојанието од неа до површината на подлогата изнесува 0,5 cm. Епруветите се инкубирани во термостат на 27 °C во времетраење од две недели. Појавата на црна боја на врвот од лентата е знак за создавање на H₂S и позитивна реакција (Арсенијевиќ, 1988).

4.4.10 Создавање на индол

Подготвена е подлога од 2% пептон и дестилирана вода и од неа се разлеани по 5 ml во епрувети со големина од 16 x 160 mm и стерилизирани во автоклав. Секој изолат е засеан во три повторувања, а резултатите се отчитувани по пет дена со додавање на 1 ml ковачев реагенс на 1 ml подлога. Појавата на црвеникава боја во времетраење од една минута, која се јавува како резултат на создавање на метил индол се оценува како позитивна реакција.

Ковачевиот реагенс се подготвува од следниве компоненти (Арсенијевиќ, 1988):

p-dimetilaminobenzaldehyd	5 g
амилалкохол	75 ml
HCl (концентрирана)	25 ml

4.4.11 Редукција на нитратите

За испитување на редукцијата на нитратите е користена методата на Fahy и Hayward. За таа цел е подготвена подлога од следниве компоненти:

Пептон	10 g
NaCl	5 g
KNO ₃	2 g
Агар	3 g
Дестилирана вода	1000 ml

Подлогата е приспособена на pH 7.0 – 7.2

Количини од по 5 ml подлога се разлевани во епрувети со големина од 16 x 160 mm и стерилизирани во автоклав. Секој изолат е засеан со убод во три повторувања и епруветите се залевани со 3% воден агар. Како контрола е користена епрувета со незасеана подлога. Појавата на добар развој на бактериите по должината на убодот е знак за позитивна реакција (Klement et al., 1990).

4.4.12 Хидролиза на ескулин

Користена е подлога подготвена од следниве компоненти:

Екстракт од квасец	5 g
NaCl	5 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,2 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
NH ₄ H ₂ PO ₄	0,5 g
Железо амониум цитрат	0,5 g
Ескулин	1 g
Агар	12 g
Дестилирана вода	1000 ml

Подлогата е приспособена на pH 6,8

Количини од по 5 ml подлога се разлевани во епрувети со големина од 16 x 160 mm и стерилизирани во автоклав. Потоа, епруветите се закосувани и сушени на собна температура. Секој изолат е засеан во три повторувања и засеаните епруветите се чувани во термостат на 27 °C во времетраење од 10 дена. Појавата на темна боја во подлогата, или појавата на флуоресценција на UV светло, е знак на позитивна реакција (Арсенијевиќ, 1988; Klement et al., 1990).

4.4.13 Акумулација на Poly-β-hydroxybutyrate (PHB)

Изолатите се засеани на NB медиум во состав:

NH ₄ H ₂ PO ₄	1 g
KCl	0,2 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,2 g
DL-β- hydroxybutyrate, sodium salt	5 g
Difco Proteose Peptone No.3	20 g

1% Nile blue solution	1 ml
1N NaOH	4,5 ml
Дестилирана вода	900 ml
Агар	17.5 g

Подлогата е приспособена на pH 7.0

Вака приготвената подлога се автоклавира и лади на околу 50 °C, по што се додаваат 100 ml од 20% раствор на глюкоза, стерилизиран преку бактериолошки филтер. Подлогата е разлеана во епрувети и закосена. На оваа подлога не флуоресцираат флуоресцентните *Pseudomonas* видови, кои се флуоресцентни на Кинг Б медиум. Резултатите се отчитувани по 24 часовен пораст на температурата од 27 °C. PHB позитивните бактерии флуоресцираат портокалово или жолто светло кога се набљудуваат под ултравиолетова светлина од 366-nm (Schaad et al., 2001).

4.5. Проучување на биохемиско-физиолошките одлики на изолатите

4.5.1. Пектолитичка активност на плочки од компир

За испитување на пектолитичката активност на добиените изолати е користена следнава метода:

Во чисти петријеви кутии се поставува навлажнета филтер хартија. Претходно измиените компири се сечат на плочки со дебелина од 7-8 mm. На површината на плочките од компир се прават вдлабнатини. За секој изолат е користена по една петријева кутија со по три плочки во неа. Се подготвува суспензија од 10^{10-12} бактерии/ml и од неа се става во вдлабнатините на резанките од компир. Како контрола е користена петријева кутија во која има резанки од компир, во чии што вдлабнатини е ставена дестилирана вода. Појавата на омекнување и гниење на плочките во наредните 24 – 48 часа е знак за позитивна реакција. Оваа карактеристика влегува во ЛОПАТ тестовите за идентификација на бактериите од родот *Pseudomonas* (Арсенијевиќ, 1988).

4.5.2. Активност на оксидаза

Приготвен е 1% раствор од N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine и вода и од него се капнуваат неколку капки на филтерска хартија. Потоа, со стерилно стапче се зема од бактеријата и се размачкува на капката. Појавата на виолетово обојување до 30 секунди е знак за позитивна реакција. Доколку обојувањето се појави во времетраење до 60 секунди, реакцијата се смета за слабо позитивна. Оваа карактеристика влегува во ЛОПАТ тестовите за идентификација на бактериите од родот *Pseudomonas* (Klement et al., 1990).

4.5.3. Активност на каталаза

Активноста на каталаза е утврдена со помош на 3% H₂O₂. Неколку капки од растворот е нанесен на предметно стакло, потоа со помош на еза се зема полн зафат од бактеријата која се меша со суспензијата на предметното стакло. Интензивната појава на меурчиња е знак за позитивна реакција (Lelliot & Stead, 1987).

4.5.4. Оксидативно ферментативен тест (О/Ф – тест)

За одредување на оксидативно-ферментативната активност на изолатите е користена подлога со следниов хемиски состав:

Пептони	2 g
K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	0,3 g
NaCl	5 g
Агар	3 g
Бромметил сино	0,03 g
Дестилирана вода	1000 ml

Подлогата е приспособена на рН 7.0 – 7.2

Количество од по 90 ml од приготвената подлога е разлевана во колби и стерилизирана во автоклав. На стерилизираната и изладена подлога на 50 °C се додавани по 10 ml, 10% D - глюкоза, стерилизирана преку бактериолошки филтер, до крајна концентрација од 1%. Со помош на стерилни пипети по 6 ml од подлогата се ставани во стерилни епрувети со големина од 16 x 160 mm. Секој изолат е засеан во 4 повторувања, од кои два во аеробни, а два во анаеробни услови.

Изолатите во анаеробни услови се залевани со парафин до 2 cm височина од епруветата.

Резултатите се отчитани по 3 дена. Појавата на жолта боја во залеаната подлога е знак за ферментативна активност на бактеријата. Отсуството на жолта боја во залеаната подлога, а присуството во незалеаната подлога, е знак за оксидативен метаболизам на бактериите (Lelliot & Stead, 1987).

4.5.5. Дехидролиза на аргинин

Подготвена е подлога (Thornley's medium A) од следниве компоненти:

Пептони	1 g
NaCl	5 g
$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	0,3 g
L(+) arginin – HCL	10 g
Фенол црвено	0,001 g
Агар	3 g
Дестилирана вода	1000 ml

Подлогата е приспособена на pH 7,2

По 5 ml од подлогата се разлевани во епрувети со големина од 16 x 160 mm и стерилизирани 10 минути во автоклав на 121 °C, бидејќи подолга стерилизација може да предизвика деградација на аргининот и промена на pH вредноста на подлогата. Секој изолат е засеан во четири повторувања, од кои два во анаеробни услови, залеани со парафин до 15 mm од височината на епруветата, и два во аеробни услови, без парафин. Епруветите се чувани во термостат на 27 °C, а резултатите се отчитувани по три дена. Промената на бојата на подлогата од розова во црвена е знак за позитивна реакција (Lelliot & Stead, 1987).

4.5.6. Активност на уреаза

Употребена е подлога дадена по Dye (1968):

$NH_4H_2PO_4$	0,5 g
K_2HPO_4	0,5 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 g

NaCl	5 g
Екстракт од квасец	1 g
Крезол црвено	0,016 g
Дестилирана вода	800 ml

Подлогата е приспособена на pH 6,8.

На вака приготвена и стерилизирана подлога, изладена до 50°C, ѝ се додаваат 200 ml 10% уреа, стерилизирана со бактериолошки филтер. Добро промешаната подлога, со помош на стерилна пипета се разлива во стерилни епрувети со големина од 16 x 160 mm. Секој изолат е засеан во три повторувања. Појавата на розова боја во подлогата по седум дена, е знак за позитивна реакција (Lelliot & Stead, 1987).

4.5.7. Осетливост спрема CuSO₄ и стрептомицинсулфат

За овие проучувања е користена подлога која содржи сахароза и пептони (SPA), со соодветна концентрација на CuSO₄ и стрептомицинсулфат од 200 µg, 100 µg, или соодветно, по потреба, може да се употреби друга концентрација. Приготвените подлоги се разливаат во стаклени колби и се автоклавираат. Стрептомицинот се додава по автоклавирањето, откако подлогата ќе се излади на 50 °C. Подготвената подлога се разлива во петриев кутии и се засејува со соодветниот изолат. За секој изолат се приготвува и контрола која не содржи CuSO₄, или стрептомицинсулфат.

Подлогата се приготвува во следниов состав:

Сахароза	20 g
Пептон (бактериски-1)	5 g
K ₂ HPO ₄	0.50 g
MgCO ₄ · 7 H ₂ O	0,25 g
Агар	15 g
Дестилирана вода	1000 ml

Подлогата е приспособена на pH 7.2 - 7.4.

Во наредните неколку дена се набљудува развојот на колониите и се проценува најниската концентрација од CuSO₄, или стрептомицинсулфат, при која нема развој на колонии од изолатите (Lelliot & Stead, 1987).

4.5.8. Користење на јаглени хидрати

Во овие тестови се вклучени повеќе јаглени хидрати: лактоза, D(-) фруктоза, D(+) гликоза, D(+) галактоза, рафиноза, сахароза, D(+) целобиоза, D(-) тартарат, L(+) тартарат, D(-) манитол, L(+) рамноза декстрин, ескулин, сорбитол, глицерол и скроб.

За испитување на способноста на бактериите за користење на одредени јаглени хидрати, како основна подлога е користена C-подлога според Dye (1968):

NH ₄ H ₂ PO ₄	0,5 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
NaCl	5 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,2 g
Екстракт од квасец	1 g
Агар	12 g
Бромкрезол пурпур	0,7 ml од 1,5% алкохолен раствор
Дестилирана вода	1000 ml

Подлогата е приспособена на pH 6,8.

Подлогата е разлеана во колби од по 200 ml и стерилизирана во автоклав. Јаглените хидрати се стерилизирани со помош на бактериолошки филтер. Сите јаглени хидрати се користени во крајна концентрација од 0,5%. Јаглените хидрати се додавани во подлогата, која е изладена на 50 °C, и благо промешани. Потоа, со стерилни пипети по 5 ml од подлогата се разлевани во стерилни епрувети со големина од 16 x 160 mm.

Скробот и ескулинот се додавани во основната подлога пред стерилизацијата. Скробот е користен како 2%, а ескулинот како 1% раствор (Šutič & Ranič, 1969). Изолатите се засеани во три повторувања, а резултатите се отчитани по 2, 4, 7 и 21 ден на одгледување на културите во термостат на 27 °C. Појавата на жолта боја на подлогата е знак за користење на дадениот јаглороден хидрат од страна на бактериите и реакцијата се оценува како позитивна (Арсенијевиќ, 1988; Klement et al., 1990).

4.5.9. BIOLOG тест

Со BIOLOG тестот е испитувана способноста на бактериите да користат различни јаглени хидрати и, врз основа на добиените резултати е извршена идентификација на видот на бактеријата со помош на софтвер. Испитувана е способноста на бактериите да користат вкупно 95 соединенија, извори на јаглени хидрати, киселини и азотни соединенија: α -cyclodextrin, dextrin, glycogen, tween 40, tween 80, N-acetyl-D-glucosamine, N-acetyl-galactosamine, adonitol, L-arabinose, D-arabitol, D-cellobiose, D-erythritol, D-fructose, L-fucose, D-galactose, gentiobiose, α -D-glucose, m-inositol, α -D-lactose, lactulose, maltose, D-mannitol, D-mannose, D-melibiose, β -methyl-D-glucoside, D-psicose, D-raffinose, L-rhamnose, D-sorbitol, sucrose, D-trehalose, turanose, xilitol, pyruvic acid methyl ester, succinic acid mono-methyl-ester, acetic acid, Cis-aconitic acid, citric acid, formic acid, D-galactonic acid lactone, D-galacturonic acid, D-gluconic acid, D-glucosaminic acid, D-glucuronic acid, α -hydroxybutyric acid, γ -hydroxybutyric acid, p-hydroxy phenylacetic acid, itaconic acid, α -keto butyric acid, α -keto glutaric acid, α -keto valeric acid, D,L-lactic acid, malonic acid, propionic acid, quinic acid, d-saccharic acid, sebacic acid, succinic acid, bromosuccinic acid, succinamic acid, glucuronamid, L-alaninamid, D-alanin, L-alanin, L-alanyl glycine, L-asparagine, L-aspartic acid, L-glutamic acid, glycyl-L-asparatic acid, glycyl-L-glutamic acid, L-histidine, hydroxy-L-proline, L-leucine, L-ornithine, L-phenylalanin, L-proline, L-proglutamic acid, D-serine, L-threonine, D,L-carnitine, γ -amino butyric acid, urocanic acid, inosine, uridine, thymidine, phenylethyl amine, putrescine, 2-aminoethanol, 2,3-butanediol, glycerol, D,L- α -glycerol phosphate, α -D-glucose-1-phosphate, D-glucose-6-phosphate.

Пред да се започне со BIOLOG тестирањето, се одредува дали бактериите се грам - позитивни или грам – негативни и се определува дали се тие ентерични или неентерични. Грам - негативните бактерии, кои покажаа позитивна реакција на тестот за активност на оксидаза, се земени како грам - негативни неентерични бактерии (GN NENT), а оние бактерии кои покажаа негативна реакција на тестот за активност на оксидаза, се земени како грам - негативни ентерични бактерии (GN ENT). Овие карактеристики се важни при работата со BIOLOG тестот, бидејќи

од нив зависи на која температура ќе бидат инкубирани бактериите и со која концентрација на растворот ќе се работи. Сите изолати се одгледувани на BUG – агар (Biolog Universal Growth media), којшто е разлеан во епрувети и е закосен. Бактериите се одгледувани во термостат на 30 °C, и засејувани два дена последователно, така што употребените бактериски колонии не беа постари од 24 часа. Од вака одгледаните бактерии е подготвен раствор со BIOLOG инокулационен флуид во следниов состав: 0,4% NaCl, 0,03% Pluronic F-68 и 0,02% Gellan Gum. Концентрацијата на растворот е приспособувана со турбидиметар. За ентеричните бактерии, концентрацијата на растворот изнесуваше 61% T, а за неентеричните 52% T. Со помош на пипета се ставени по 150 µl во секој отвор од GN 2 BIOLOG микро садот (GN2 BIOLOG Micro Plate). Садовите се инкубирани во термостат на 30 °C во времетраење од 24 часа. По истекот на времето, резултатите се отчитувани визуелно и внесени во софтвер со база на податоци за идентификација на видот на бактеријата.

4.6. Идентификација врз основа на генетските карактеристики

4.6.1 Polimerase Chain Reaction (PCR)

4.6.1.1 Multiplex PCR протокол за идентификација на *Pseudomonas corrugata* и *Pseudomonas mediteranea*

PCR амплификација е работена според протоколот на Vittoria Cattara (2000) за идентификација на бактеријата *P. corrugate*, со употреба на следниве праймери:

PC 1/1	5'- GGATATGAGCCAGGTCTTCG - 3'
PC 1/2	5' - CGCTCAAGCGCGACTTCAG - 3'
PC 5/1	5' - CCACAGGACAACATGTCCAC - 3'
PC 5/2	5' - CAGGCGCTTTCTGGAACATG - 3'

4.6.1.2 Подготовка на бактериите

За ова испитување се користени бактериски колонии не постари од 24 часа, одгледувани на подлога NA.

4.6.1.3 Подготовка на микс

Подготвен е микс за 25 µl по примерок. Миксот за еден примерок е приготвен од следниве компоненти:

Дестилирана вода	16,5 µl
10 x Buffer	2,5 µl
MgCl ₂	0,75 µl
dNTPs	1 µl
Прајмер I	1 µl
Прајмер II	1 µl
Прајмер III	1 µl
Прајмер IV	1 µl
Tag Polimerase	0,25 µl

Миксот добро се меша со електронска мешалка и потоа по 23,5 µl се додавани во тубички од 2 ml.

4.6.1.4 Изолирање на ДНА

Екстракцијата на геномската ДНА е извршена со китови (PureLink Genomic DNA Kits, Invitrogen), според пропишаниот протокол од производителот. Во секоја од микро - тубичките со по 23,5 µl микс се додава 1 µl од екстрахираната ДНА.

Според овој протокол (Catara, 2000), PCR асмплификацијата може да се изврши и без изолација на DNA од бактериската клетка, со директен PCR со земање на мало количество од бактериската колонија.

4.6.1.5 PCR протокол

1. Иницијална денатурација на 94 °C за време од 5 минути;
2. Денатурација на 94 °C за време од 30 секунди;
3. Анилирање на 62 °C за време од 30 секунди;
4. Елонгација на 72 °C за време од 1 минута;
5. Финална елонгација на 72 °C за време од 5 минути.

Повторување на 2, 3 и 4-от чекор 30 пати, така што вкупниот број циклуси изнесува 31.

4.6.1.6 Анализирање на примероците

Анализирањето на примероците е извршено во 1% агарозна гел - електрофореза со напон од 100 V за време од 20 минути.

Гелот за лодирање на примероците е приготвен како 1% агарозен гел (TBE пуфер и агар (Agarose electrophoresis grade - Invitrogen)) и е ставен да отстои во етидиум бромид околу 5 минути, по што е извршено отчитување на гелот со помош на UV светлина.

4.7. Статистичка обработка на податоците

4.7.1 Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis

System – NTSYSpc

Статистичка обработка на вкупно 124 анализи, е направена со програмата NTSYSpc (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System), со модулот SAHN (Rohlf, 1994). Анализата на податоците е направена со методата на UPGMA и Dice коефициент, а резултатот е прикажан во вид на филогенетско дрво на сличност.

5. РЕЗУЛТАТИ

5.1. Распространетост и економско значење

Република Македонија во текот на целата година е значаен производител на домати. Во зимскиот солстициум, производството на домати и на други градинарски култури се врши во оранжерии и пластеници, кои претставуваат погодна средина за развој на разни видови болести и штетници. Следејќи ја здравствената состојба на градинарските култури во Струмичкиот регион, како еден од најзначајните региони за производство на градинарски култури во заштитен простор, е забележана појава на некроза на стеблото кај домотот. Симптомите за прв пат се забележани во март, 2005 година кај домати од сортата „беле“, одгледувани во пластеници во околината на Струмица, во селото Просениково. Степенот на заболеност на растенијата во одделни случаи кај индивидуалните производители изнесуваше и до 70 %. Во мај 2006 година, слични симптоми повторно се забележани во селото Просениково, но и во селата Моноспитово и Куклиш, и тоа кај сортите „беле“ и „магнус“. Наредната 2007 година, болеста се прошири и во селото Пиперево, а симптоми беа забележани и кај домати садени на отворено, сорта „пик рајп“ во селото Ерџелија, во околината на градот Штип. Во мај 2008 година состојбата беше значително влошена кај одредени индивидуални производители во селата Просениково и Куклиш, каде болеста во некои случаи имаше зафатено околу 90% од растенијата (Табела 1).

Од теренските испитувања, направени во текот на 2005, 2006, 2007 и 2008 година, може да се заклучи дека болеста во Струмичкиот регион, од година во година добива сè поголеми размери, и тоа најмногу во пластеничкото производство на домати (Сл. 1). Симптомите беа забележани кај одделни индивидуални производители, кај кои болеста имаше зафатено и до 80% од растенијата во еден пластеник. Во околината на Штип, вакви симптоми не беа забележани во оранжериското производство на домати. Симптоми беа забележани на отворено, и тоа во селото Ерџелија. Кај заболените растенија, плодносењето и квалитетот на плодовите беа значително намалени.

5.2. Симптоми на болеста

Почетните симптоми на заболувањето се забележуваат надворешно, во вид на венење на долните гранки, на кои листовите полека го губат тургорот и хлорофилот (Сл. 2). Со развојот на болеста, листовите на заболените гранки се сушат, и тоа почнувајќи од работ кон средината на листот, свиткувајќи се кон внатрешноста (Сл. 3). На крајот, целиот лист е сув и извиткан навнатре. Сувите листови не паѓаат од гранките, туку остануваат на нив. Откако листовите ќе се исушат, почнуваат да се сушат и гранките (Сл. 4). Симптомите од долните листови се шират кон горните гранки. Целото растение, на прв поглед, покажува симптоми на заболест од трахеобактериози. Плодоносењето кај заболените растенија е нормално и на плодовите не се забележуваат никакви симптоми (Сл. 5 и сл. 7)

Во подоцнежниот развој на болеста, стеблото се цепа и се појавуваат кафеави лезии, низ кои многу често може да се види внатрешноста која е некротирана (Сл.6, сл.7 и сл.8). Лезиите достигнуваат должина и до 30 cm. Кај некои растенија, цепањето на стеблото по должина отсуствува, но стеблото е здебелено и меко на допир поради деструктираната внатрешност. Гранките и стеблото се набабрени, а многу често по должината на стеблото се забележува појава на адвентивни коренчиња (Сл. 9). При напречен пресек на стеблото, се забележува појава на некроза на сржта која добива кафеава боја (Сл.6 и сл. 7). Во почетниот стадиум, сржта е влажна и мека (Сл. 9), но со напредувањето на болеста, некротата сè повеќе се шири по должината на стеблото и на крајот сржта е потполно исушена, односно стеблото од внатре е „празно“ (Сл. 10). Ширејќи се, некротата од стеблото ги зафаќа и гранките. Плодовите, кои дотогаш нормално се развивале, почнуваат да заостануваат во растот, не можат да созреат до крај, имаат жолто-црвена боја и намален квалитет (Сл. 5). Симптомите на плодовите се секундарни и се јавуваат како резултат на тоа што внатрешноста на растението е некротирана, функцијата на спроводните садови е нарушена и тие не можат да ги пренесат хранливите материи до плодот, поради што тој заостанува во растот и губи од квалитетот. Овие симптоми можат помалку или повеќе да се манифестираат, во

зависност од тоа дали инфекцијата настанала порано или подоцна во развојот на растението, како и од временските услови. Влажното време и ниските температури го фаворизираат напредокот на болеста. Доколку, пак, временските услови се неповолни, односно температурите се високи и релативната влажност на воздухот е ниска, а заразата настанала во подоцнежниот развој, растенијата се опоравуваат и нормално се развиваат и плодноносат. Колку што е растението помладо, толку побрзо и посилно се манифестираат симптомите со целосен колапс и изумирање на растението.

Кореновиот систем кај заболените растенија се развива нормално и не покажува никакви симптоми на заболување.

5.3 Изолација и општи карактеристики на добиените изолати

Изолирањето на бактериите е направено од стеблата на зболени растенија од домати, кои покажуваа симптоми на „TPN“, на хранлива подлога со CaCO_3 (YDCA). Добиени се повеќе видови колонии со различни нијанси на кремovo - бела до жолта боја на колониите кои испуштаат кафеав, жолт, жолто-зелен или сино-зелен пигмент во подлогата. Во текот на четиригодишните истражувања, испитани се околу 150 изолати, но како предмет на испитување во оваа магистерска теза се земени колониите со следниве шифри: Ds-4, Ds-4/1, Ds-4/2, Ds-12, Ds-12/1, Ds-12/2, Ds-13, Ds-13/1, Ds-13/2, S-2.1, S-2.2, S-2.3, S-2.4 и контролните изолати IPVCT 10.3 (*P. corrugata*) и IPVCT 9.1 (*P. mediterranea*) од Италија, P.m (*P. mediterranea*) од Турција, LMG 2891 (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) од Унгарија, LMG 2595 (*Pantoea agglomerans*) од Африка, LMG 5850 (*P. marginalis*) од САД, LMG 5085 (*P. syringae* pv. *syringe*) и LMG 5396 (*P. viridiflava*) од Нов Зеланд и USB 1201 (*P. fluorescence*) од Италија (Табела 2). На овие изолати се потврдени Коховите постулати за патогеност и направени се основните тестови за детерминација (LOPAT тестови), како и други значајни биохемиски, физиолошки и генетски испитувања.

5.3.1 Патогени карактеристики на добиените изолати

5.3.1.1 Реакција на хиперсензибилност на листови од тутун

Хиперсензибилна реакција на листови од тутун за 24 часа покажаа изолатите: Ds-4, Ds-4/1, Ds-4/2, Ds-12, Ds-12/1, Ds-12/2, Ds-13, Ds-13/1, Ds-13/2, S-2.1, S-2.2, S-2.3, S-2.4, P.m, IPVCT 9.1, LMG 2891, LMG 5085 и LMG 5850 додека, пак, изолатите IPVCT 10.3, LMG 2595, LMG 5396 и негативната контрола не покажаа хиперсензибилна реакција на листови од тутун (Сл. 10). Кај изолатите со позитивна реакција е забележана промена на ткивото на листот во вид на потемнување на делот од листот помеѓу двата соседни нерва којшто е инокулиран. Овој дел од листот станува просирен, сјаен и потенок од неинокулираниот дел. На делот од листот, инокулиран со негативната контрола и контролите IPVCT 10.3, LMG 2595 и LMG 5396, не беше забележана никаква промена на ткивото.

5.3.1.2 Инокулација со убод во стеблото

Изолатите Ds-4, Ds-4/1, Ds-4/2, Ds-12, Ds-12/1, Ds-12/2, Ds-13, Ds-13/1, Ds-13/2, S-2.1, S-2.2, S-2.3, S-2.4, IPVCT 10.3, IPVCT 9.1, LMG 5085 покажаа позитивна реакција. Кај растението инокулирано со изолатот Ds-4 симптомите беа забележани најрано по една недела. Првите забележани симптоми беа во вид на добивање кафеава боја и сушење на инокулираниот дел од стеблото, кое на тоа место се истенчува поради деструктурираната внатрешност. Токму на ова место, растението по кусо време се прекршува, не можејќи да ја издржи сопствената тежина. Колку што бактеријата напредува, сè поголем дел од стеблото станува „празен“, истенчен и овенат, но ја задржува зелената боја. На крајот целото растение е овенато (Слика 11). Кај дел од растенијата симптомите се манифестираа во вид на појава на кафејави лезии по стеблото кои почнуваат од местото на инокулацијата и се шират нагоре и надолу по должината на главното стебло (Слика 12). На крајот почнуваат да венеат гранките и целото растение (Слика 13). Кај овие растенија е забележана и појава на адвентивни коренчиња (Слика 12). Вакви симптоми се забележани и кај позитивната контрола IPVCT 9.1 (Слика 14), додека, пак, кај негативната контрола не се забележани никакви промени (Слика 15).

5.3.1.3 Инокулација со убод во аксилот

Првите симптоми од инокулацијата беа забележани по пет дена кај растението инокулирано со изолатот Ds-4. Симптомите се манифестираа во вид на истенчување и венење на главното стебло, кое започнува од местото на убодот и се шири кон најблиската гранка. Потоа, венењето се прошири кон соседните блиски гранки (Слика 16), се додека растението целосно не се исуши (Сл. 17). Истите симптоми се забележани и кај позитивната контрола (Сл. 18). Кај негативната контрола не беа забележани никакви промени (Сл. 19).

5.3.1.4 Патогени карактеристики кај реизолатите

Од вештачки инокулираните растенија е направена реизолација на бактеријата на подлога YDCA. Реизолатите беа идентификувани и детерминирани со истите тестови и постапки со кои беа испитувани и оригиналните изолати.

Патогеноста им беше потврдена со инокулација со еден убод во стеблото на растенија од домати стари четири недели. Реизолатите, исто како и изолатите, покажаа позитивна реакција на патогеност кај инокулираните домати, и тоа за многу кратко време, по пет до седум дена од инокулацијата. Симптомите беа исти како и кај изолатите. Најпрво, стеблото околу местото на убодот добива кафеава боја и почнува да се суши, односно се истенчува, поради што растението се прекршува (Сл. 20). Колку што бактеријата напредува, растението венее и целото се суши (Сл.22). Кај дел од растенијата имаше појава на кафеави лезии, кои почнуваа од местото на убодот и се ширеа по должината на стеблото (Сл. 21). Кај позитивната контрола се манифестираше симптом на венење по пет дена (Сл.23), а негативната контрола не покажа никаква промена (Сл. 24).

5.5 LOPAT и грам-карактеристики на изолатите

Боењето според Грам покажа дека сите изолати се бојат негативно, освен изолатот LMG 2891, кој покажа дека според Грам се бои позитивно.

Создавањето на леван е испитувано по два дена развој на хранлива подлога збогатена со 5% сахароза (NAS) на температура од 27 °C.

Испитуваните изолати Ds-4, Ds-4/1, Ds-4/2, Ds-12, Ds-12/1, Ds-12/2, Ds-13, Ds-13/1, Ds-13/2, S-2.1, S-2.2, S-2.3, S-2.4 и контролните изолати IPVCT 10.3, IPVCT 9.1, P.m, LMG 5396, LMG 2595, LMG 5850 и LMG 2891, на хранлива подлога-NAS не создаваат леван. Ds-4, Ds-4/1, Ds-4/2, Ds-12, Ds-12/1, Ds-12/2, Ds-13, Ds-13/1, Ds-13/2, S-2.1, S-2.2, S-2.3 и S-2.4 испуштаат дифузен жолто-зелен пигмент во хранливата подлога. Колониите имаат димензии околу 2 mm со темнозеленикаво-кафеав централен дел од колонијата, која има набрана површина. Прегледот под бинокулар покажа дека рабовите на колониите се брановидни, но површината им е послабо набрана отколку на хранлива месопептонска подлога (NA), како и миризбата која сега е многу послаба, а конзистенцијата им е восочна (Сл. 25 и сл. 27). IPVCT 10.3 создава колонии со темнозелен централен дел и кремиви рабови. Имаат многу набрана површина во форма на цвет и восочна конзистенција (Сл.26). PVCT 9.1 и P.m формираат кремиви колонии со темнозелена боја во централниот дел, кои испуштаат жолт дифузен пигмент во хранливата подлога, а конзистенцијата им е восочна. Под бинокулар, површината им е набрана, а рабовите им се ситно назабени. LMG 5396 формира кремиви колонии со потемен кафеав централен дел и дијаметар од околу 2 mm. Под бинокулар имаат концентрично прстенеста сјајна површина, правилни рабови, потемен централен дел и густа путерна конзистенција (Сл. 28). LMG 5850 формира кремово бели крупни колонии со дијаметар од околу 3-4 mm и испакнат централен дел. Имаат густа конзистенција на путер и не се просирни. Под бинокулар имаат мазна површина и брановидни рабови. LMG 2891 на оваа хранлива подлога создава многу ситни точкести колонии со дијаметар од околу 0,5 mm, кремово бела боја и воденеста конзистенција. LMG 2595 создава жолти колонии со дијаметар од околу 2 mm, силно набрана површина, неправилни назабени рабови и кожеста конзистенција.

Изолатите LMG 5085 и LMG 1201 формират леван со типични колонии од леван тип. Крупни кремово бели, сјајни, присирни и кружно

испакнати. Колониите кај изолатот LMG 1201 се покрупни, со дијаметар од 4 mm за разлика од колониите на изолатот LMG 5085, кои се поситни со дијаметар од околу 3 mm.

Гниење на плочки од компир, односно пектолитичка активност, покажаа само LMG 5850 и LMG 5396. Реакциите на присуство на цитохром оксидаза се позитивни за сите изолати, освен за LMG 2891, LMG 2595, LMG 5085 и LMG 5396. Дехидролиза на аргинин вршат сите изолати, освен LMG 5396 и LMG 5085 (Табела 3). Хиперсензибилност на листови од тутун, како што беше претходно спомнато, покажаа изолатите Ds-4, Ds-4/1, Ds-4/2, Ds-12, Ds-12/1, Ds-12/2, Ds-13, Ds-13/1, Ds-13/2, S-2.1, S-2.2, S-2.3 S-2.4, PVCT 9.1, P.m, LMG 2891, LMG 5085 и LMG 5850, додека пак, изолатите PVCT 10.3, LMG 2595, LMG 5396 и негативната контрола, не покажаа хиперсензибилност на листови од тутун.

Прегледот на лопат и грам - карактеристиките на сите изолати е прикажан во табелата број 3.

5.6 Одгледувачки карактеристики на изолатите

5.6.1 Изглед на колониите на подлога NA

Карактеристиките на колониите се детерминирани по три дена развој, на температура од 27 °C, кога е забележан добар развој на колониите .

Изолатите Ds-4, Ds-4/1, Ds-4/2, Ds-12, Ds-12/1, Ds-12/2, Ds-13, Ds-13/1, Ds-13/2, S-2.1, S-2.2, S-2.3 и S-2.4 на NA подлога се развиваат за три дена и имаат кремово бела боја со потемен кафеаво-зелен центар и димензии од околу 2,5 mm. Испуштаат непријатна и остра миризба, која потсетува на изгниен зеленчук. Прегледот на колониите под бинокулар покажа дека површината им е рапава, со испакнат централен дел, а рабовите им се неправилни и брановидни (Сл. 29). Конзистенцијата им е сува и восочна.

IPVCT 10.3 (*Pseudomonas corrugata*), на истата подлога NA, има кремово бела боја со нешто потемен централен дел со кафеаво зелена нијанса и дијаметар од околу 2 mm. Ослободува непријатна миризба, иста како и нашите изолати со шифри Ds и S, која потсетува на изгниен зеленчук, а добар развој има за три дена. Прегледот под бинокулар

покажа дека и оваа бактерија формира колонии со рапава површина и брановидни рабови, а испакната е во вид на пресечен конус (Сл.30).

IPVCT 9.1 и P.m (*Pseudomonas mediterranea*) имаат кремova боја на колониите со јасно кафеаво-портокалов централен дел. Сјајни се и испакнати со димензии од околу 1,5-2 mm, со остра миризба на гнил зеленчук. Бинокуларниот преглед покажа дека имаат рапава површина и неправилни брановидни и назабени рабови. Исто така развојот на оваа подлога им е за три дена (Сл. 31 и Сл. 32).

Развојот на изолатот LMG 2891 (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) трае околу пет дена, а колониите се тркалезни, со темножолта боја, кружно испакнати, сјајни, непроѕирни и ситни, со дијаметар од околу 1-1,5 mm. Прегледот под бинокулар покажа дека имаат мазна површина и рамни правилни рабови. Ослободуваат слаба миризба на квасец.

Изолатот LMG 5085 (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*) формира кремovo бели колонии, со дијаметар од околу 3 mm. Централниот дел на колонијата е со малку потемна нијанса. Колониите се сјајни, не се испакнати, со рапава површина и нерамни рабови. Ослободуваат остра непријатна миризба на квасец. Дobar развој имаат за два до три дена.

LMG 5396 (*Pseudomonas viridiflava*) се развива, исто така, за три дена и формира кремovo бели и сјајни колонии коишто, кога се набљудуваат под бинокулар, имаат изглед на „око“ со концентрично прстенеста површина, нерамни рабови и испакнат, мазен и сјаен централен дел во вид на „купа“. И оваа бактерија испушта многу силна и непријатна миризба на квасец (Сл. 33).

LMG 2595 (*Panoea agglomerans*), на NA подлога за три дена развива колонии со жолта боја и димензии од околу 2 mm. Колониите под бинокулар имаат многу рапава површина и изглед на „пржено јајце“, со неправилни и нерамни рабови. Ослободува слаба миризба на квасец.

Изолатот LMG 5850 (*Pseudomonas marginalis*) формира сјајни колонии со кремovo бела боја и димензии од околу 2-2,5 mm. Под бинокулар, површината на колонијата е сјајна, концентрично прстенеста, слабо испакната, со правилни рабови. Ослободува остра непријатна миризба на киселина (Сл. 34).

USB 1201 (*Pseudomonas fluorescens*) формира кремиви колонии, многу слабо испакнати, со дијаметар од околу 3 mm, просирни, кои кога се набљудуваат под бинокулар, имаат мазна сјајна површина и правилни рабови.

5.6.2 Изглед на колониите на подлога YDCA

Прегледот на колониите е направен по пет дена развој, на температура од 27 °C.

Изолатите Ds-4, Ds-4/1, Ds-4/2, Ds-12, Ds-12/1, Ds-12/2, Ds-13, Ds-13/1, Ds-13/2, S-2.1, S-2.2, S-2.3, S-2.4, IPVCT 10.3, IPVCT 9.1 и P.m формираат слични колонии, со дијаметар од околу 2 mm, кремиви рабови и темен зелено-син обоен централен дел. Бинокуларниот преглед покажа дека површината им е силно набрана, а рабовите ситно назабени (Сл. 35, сл.36 и сл. 37).

Колониите кај реизолатите имаат, исто така, набрана површина, со ситно назабени рабови и послаба пигментација во централниот дел од колонијата, којшто е слабо испакнат (Сл. 38).

Кај изолатите Ds-4, Ds-4/1, Ds-4/2, Ds-4/3, Ds-12, Ds-12/1, Ds-12/2, Ds-13, Ds-13/1, Ds-13/2, S-2.1, S-2.2, S-2.3, S-2.4, IPVCT 10.3, IPVCT 9.1 и P.m се забележуваа колонии со идентичен изглед и големина, но со мазна површина, или без присуство на пигмент (Сл. 34). Ваквите колонии се, всушност, мутанти на родителската клетка, кои се јавуваат во текот на култивирањето (Cattara et al., 2007).

На хранлива подлога Кинг Б флуоресцираат само изолатите LMG 5850, LMG 5085 и USB 1201, додека пак, Ds-4, Ds-4/1, Ds-4/2, Ds-12, Ds-12/1, Ds-12/2, Ds-13, Ds-13/1, Ds-13/2, S-2.1, S-2.2, S-2.3 S-2.4, IPVCT 10.3, IPVCT 9.1, LMG 2595, LMG 5396, LMG 2891, не покажаа флуоресцентност.

Потоа е испитувана способноста на изолатите да се развиваат на 4 °C, 37 °C и 41 °C. Добиените резултати покажаа дека на 4 °C се развиваат сите изолати, освен LMG 2891, на 41 °C се развива само LMG 5850, а на 37 °C се развиваат сите изолати, освен LMG 2891, LMG 5085 и LMG 5396.

Толерантност спрема 5% NaCl покажаа Ds-12, Ds-12/1, Ds-12/2, IPVCT 10.3, P.m, LMG 2595, LMG 5850 и USB 1201. Изолатите со шифра

Ds-4, Ds-4/1, Ds-4/2, Ds-13, Ds-13/1, Ds-13/2, IPVCT 9.1, LMG 2891 и LMG 5085, покажаа многу слаб развој, додека, пак, кај изолатот LMG 5396 немаше развој при концентрација од 5% NaCl. На концентрација од 7% NaCl толерантни се само LMG 2595 и LMG 5850, многу слабо се развиваат LMG 5085 и USB 1201, додека, пак, сите останати изолати не покажаа толерантност спрема NaCl во концентрација од 7%.

Скробот го хидролизираат изолатите LMG 2595, LMG 5085, LMG 5396 и USB 1201. Желатинот го разлагаат сите изолати веќе по три дена развој, освен LMG 2595, кој го разлага на седмиот ден, и LMG 5850, кој воопшто не го разложува. Амонијак од пептон создаваат сите испитувани изолати, а H_2S од пептон создаваат само изолатите LMG 2891, LMG 2595. Редукција на нитрати предизвикуваат сите изолати, освен LMG 5396, LMG 5850, LMG 5085 и USB 120, кои не покажаа дека можат да извршат редукција на нитратите во нитрити. Хидролиза на ескулин предизвикуваат само LMG 2891, LMG 2595, LMG 5085 и LMG 5396 (Таб. 4). Poly- β -hydroxyburate акумулираат сите изолати, освен LMG 2891, LMG 2595, LMG 5850, LMG 5085, LMG 5396 и USB 1201. Редукција на *meso*-tartrat вршат сите изолати, освен IPVCT 10.3, LMG 2891 и LMG 2595. D-(-) tartrat го користат, исто така, сите изолати, освен LMG 2595, LMG 5085 и LMG 2891. Редукција на 2-ketogluconate, исто така, вршат сите изолати, освен IPVCT 10.3, LMG 2891 и LMG 2595, а histamine—от не можат да го користат IPVCT 10.3, USB 1201, LMG 2891, LMG 5850 и LMG 2595. Индол користат сите, освен LMG 2595.

5.7 Биохемиско-физиолошки одлики на изолатите

Активност на каталазата поседуваат сите изолати, додека пак, активност на уреаза не поседува само изолатот LMG 2891. Оксидативна активност имаат сите изолати, а ферментативна само LMG 2595. Тестот за осетливост на $CuSO_4$ покажа дека при концентрација од 200 $\mu g/ml$ $CuSO_4$ нема развој на ниту еден изолат, додека пак, при концентрација од 100 $\mu g/ml$, многу слаб развој има кај изолатите IPVCT 10.3, P.m и USB 1201. Кај изолатите LMG 5850 и LMG 5396 се забележа нормален развој. На концентрација од 70 $\mu g/ml$ $CuSO_4$, кај изолатите Ds-4, Ds-4/1, Ds-4/2, Ds-13, Ds-13/1, Ds-13/2, RDs-4 и RDs-13 имаше развој на само една

колонија, а кај S-2.1, S-2.2, S-2.3, S-2.4, Ds-12, Ds-12/1 и Ds-12/2 развојот беше многу слаб. Кај контролните изолати PVCT 10.3, PVCT 9.1, P.m, LMG 5850 и LMG 5396, развојот беше нормален, а кај LMG 2595, LMG 5085 и USB 1201 немаше развој. При концентрација од 50 µg/ml CuSO₄ се забележа нормален развој кај сите испитувани изолати, со тоа што развојот кај RDs-4 беше најслаб. Позитивните контроли кај сите изолати беа добро развиени.

Стрептомицинсулфатот, во концентрација од 200 µg/ml, го спречува развојот кај сите испитувани видови, но концентрацијата од 100 µg/ml не може да го спречи развојот на LMG 2595, LMG 5850, LMG 5085, LMG 5396 и USB 1201. Во концентрација од 70 µg/ml стрептомицинсулфат, во хранлива подлога се развиваа само изолатите LMG 5850, LMG 5085, LMG 5396, LMG 2595 и USB 1201 (Табела 4а).

5.8 BIOLOG карактеристики

Резултатите од BIOLOG испитувањата покажаа дека изолатите Ds-4, Ds-4/1 и Ds-4/2 му припаѓаат на видот *P. corrugata*, и тоа со процент од 95%, индекс на совпаѓање од 0,593 и индекс на оддалеченост 5,84. Овие изолати ги користат следниве соединенија: tween 80, tween 40, L-arabinose, D-arabitol, D-fructose, D-galactose, α-D-glucose, m-inositol, D-mannitol, D-mannose, D-psicose, sucrose, D-trehalose, pyruvic acid methyl ester, succinic acid mono-methyl-ester, acetic acid, cis-aconitic acid, citric acid, formic acid, D-galactonic acid lactone, D-gluconic acid, D-glucosaminic acid, α-hydroxybutyric acid, β-hydroxybutyric acid, p-hydroxy phenylacetic acid, α-keto glutaric acid, D, L-lactic acid, malonic acid, propionic acid, D-saccharic acid, succinic acid, bromosuccinic acid, D-alanin, L-alalnin, L-alanyl-glycine, L-asparagine, L-aspartic acid, L-glutamic acid, glycil-L-glutamic acid, L-histidine, hydroxy-L-proline, L-leucine, L-proline, L-pyroglutamic acid, D-serine, L-serine, L-threonine, γ-aminobuturic acid, urocanic acid, inosine, 2-aminoethanol, glycerol и D,L-α-glycerol phosphate. Не ги користат соединенијата: α – cyclodextrin, dextrin, N-acetyl-D-glucosamine, N-acetyl-D-galactosamine, adonitol, D-cellobiose, i-erythritol, L-fucose, gentibiose, α-D- lactose, lactulose, maltose, D-mellibiose, β-methyl-D-glucoside, D-raffinose, L-rhamnose, D-sorbitol, turanose, xylitol, D-galacturonic acid, D-

glucuronic acid, γ -hydroxybuturic acid, itaconic acid, sebacic acid, succinamic acid, glucuronamid, glycyl-L-aspartic acid, L-phenylalanine, thymidine, phenylethylamine, putrescine, 2,3-butanediol, α -D-glucose-1-phosphate и D-glucose-6-phosphate. Реакцијата со следниве соединенија е варјабилна: glycogen, L-alaninamide, α -keto buturic acid, α -keto valeric acid, quinic acid, L-ornithine, D,L-carnitine и uridine.

Изолатите Ds-12, Ds-12/1 и Ds-12/2, исто така, му припаѓаат на видот *P. corrugata*, со процент од 100%, но со индекс на сличност од 0,692 и индекс на оддалеченост од 4,67. Овие изолати ги користат следниве соединенија: glycogen, tween 80, tween 40, L-arabinose, D-arabitol, D-fructose, D-galactose, α -D-glucose, m-inositol, D-mannitol, D-mannose, β -methyl-D-glucoside, D-psicose, sucrose, D-trehalose, pyruvic acid methyl ester, succinic acid mono-methyl-ester, acetic acid, Cis-aconitic acid, citric acid, formic acid, D-galactonic acid lactone, D-galacturonic acid, D-gluconic acid, D-glucosaminic acid, α -hydroxybutyric acid, β -hydroxybutyric acid, p-hydroxy phenylacetic acid, α -keto glutaric acid, α -keto buturic acid, α -keto valeric acid, D,L-lactic acid, malonic acid, propionic acid, quinic acid, D-saccharic acid, succinic acid, bromosuccinic acid, L-alaninamide, D-alanin, L-alalnin, L-alanyl-glycine, L-asparagine, L-aspartic acid, L-glutamic acid, glycyl-L-glutamic acid, L-histidine, hydroxy-L-proline, L-leucine, L-ornithine, L-proline, L-pyroglutamic acid, D-serine, L-serine, L-threonine, γ -aminobutyric Acid, D,L-carnitine, urocanic acid, inosine, uridine, putrescine, 2-aminoethanol, glycerol и D,L- α -glycerol phosphate. Не ги користат следниве соединенија: α -cyclodextrin, dextrin, N-acetyl-D-glucosamine, N-acetyl-D-galactosamine, adonitol, D-cellobiose, i-erythritol, L-fucose, gentibiose, α -D-lactose, lactulose, maltose, D-mellibiose, D-raffinose, D-sorbitol, turanose, xylitol, γ -hydroxybuturic acid, itaconic acid, sebacic acid, glucuronamid, glycyl-L-aspartic acid, thymidine, phenylethylamine, 2,3-butanediol, L-rhamnose, D-glucuronic acid, α -D-glucose-1-phosphate и D-glucose-6-phosphate. Реакцијата со L-phenylalanine е варијабилна.

Изолатите Ds-13, Ds-13/1 и Ds-13/2 покажаа дека припаѓаат на *P.corrugata* со 95%, индекс на сличност од 0.600 и индекс на оддалеченост од 5,67. Се покажа дека овие изолати ги користат следниве соединенија: glycogen, tween 80, tween 40, L-arabinose, D-

arabitol, D-cellobiose, i-erythritol, D-fructose, D-galactose, α -D-glucose, m-inositol, D-mannitol, D-mannose, D-psicose, sucrose, D-trehalose, pyruvic acid methyl ester, succinic acid mono-methyl-ester, acetic acid, cis-aconitic acid, citric acid, formic acid, D-galactonic acid lactone, D-galacturonic acid, D-gluconic acid, D-glucosaminic acid, α -hydroxybutyric acid, β -hydroxybutyric acid, p-hydroxy phenylacetic acid, α -keto glutaric acid, α -keto buturic acid, α -keto valeric acid, D,L-lactic acid, malonic acid, propionic acid, quinic acid, D-saccharic acid, succinic acid, bromosuccinic acid, L-alaninamide, D-alanin, L-alalnin, L-alanyl-glycine, L-asparagine, L-aspartic acid, L-glutamic acid, glycil-L-glutamic acid, L-histidine, hydroxy-L-proline, L-leucine, L-ornithine, L-proline, L-pyroglutamic acid, D-serine, L-serine, L-threonine, γ -aminobuturic Acid, D,L-carnitine, urocanic acid, inosine, uridine, putrescine, 2-aminoethanol, glycerol и D,L- α -glycerol phosphate. Не ги користат соединенијата: α -cyclodextrin, N-acetyl-D-glucosamine, N-acetyl-D-galactosamine, adonitol, L-fucose, gentibiose, α -D-lactose, lactulose, maltose, D-mellibiose, β -methyl-D-glucoside, D-raffinose, D-sorbitol, turanose, xylitol, L-rhamnose, γ -hydroxybuturic acid, sebacic acid, succinamic acid, glucuronamid, glycyl-L-aspartic acid, thymidine, phenylethylamine, 2,3-butanediol, α -D-glucose-1-phosphate и D-glucose-6-phosphate. Реакциите со: dextrin, itaconic acid и L-phenylamine се варијабилни.

Изолатот S-2.1 покажа дека му припаѓа на видот *Pseudomonas corrugata* со процент од 95%, индекс на сличност 0,583 и индекс на оддалеченост 6,00. Ги користи следниве соединенија: glycogen, tween 80, tween 40, L-arabinose, D-arabitol, D-fructose, D-galactose, α -D-glucose, m-inositol, D-mannitol, D-mannose, D-psicose, sucrose, D-trehalose, pyruvic acid methyl ester, succinic acid mono-methyl-ester, acetic acid, cis-aconitic acid, citric acid, formic acid, D-galactonic acid lactone, D-galacturonic acid, D-gluconic acid, D-glucosaminic acid, D-glucuronic acid, α -hydroxybutyric acid, β -hydroxybutyric acid, p-hydroxyphenylacetic acid, α -keto glutaric acid, D,L-lactic acid, malonic acid, propionic acid, quinic acid, D-saccharic acid, succinic acid, bromosuccinic acid, L-alaninamide, D-alanin, L-alalnin, L-alanyl-glycine, L-asparagine, L-aspartic acid, L-glutamic acid, glycil-L-glutamic acid, L-histidine, hydroxy-L-proline, L-leucine, L-proline, L-pyroglutamic acid, D-serine, L-serine, L-threonine, γ -aminobuturic acid, urocanic acid, inosine, 2-

aminoethanol, glycerol и D,L- α -glycerol phosphate. Не ги користи соединенијата: i-erythritol, α -keto valeric acid, itaconic acid, L-ornithine, L-phenylalanine D,L-carnitine, putrescine, α -cyclodextrin, N-acetyl-D-glucosamine, N-acetyl-D-galactosamine, adonitol, L-fucose, gentibiose, α -D-lactose, lactulose, maltose, D-melibiose, β -methyl-D-glucoside, D-raffinose, L-rhamnose, D-sorbitol, turanose, xylitol, γ -hydroxybuturic acid, sebacic acid, succinamic acid, glucuronamid, glycyl-L-aspartic acid, thymidine, phenylethylamine, 2,3-butanediol, α -D-glucose-1-phosphate. Реакциите со: dextrin, D-cellobiose, α -keto buturic acid, uridine и D-glucose-6-phosphate се варијабилни.

Изолатот S-2.2 покажа дека му припаѓа на видот *Pseudomonas corrugata*, со процент од 97%, индекс на сличност 0,543 и индекс на оддалеченост 6,87. Ги користи следниве соединенија: tween 80, tween 40, L-arabinose, D-arabitol, D-fructose, D-galactose, α -D-glucose, m-inositol, D-mannitol, D-mannose, D-psicose, sucrose, D-trehalose, pyruvic acid methyl ester, succinic acid mono-methyl-ester, acetic acid, cis-aconitic acid, citric acid, formic acid, D-galactonic acid lactone, D-galacturonic acid, D-gluconic acid, D-glucosaminic acid, D-glucuronic acid, α -hydroxybutyric acid, β -hydroxybutyric acid, p-hydroxyphenylacetic acid, α -keto glutaric acid, D,L-lactic acid, D,L-carnitine, malonic acid, propionic acid, quinic acid, D-saccharic acid, succinic acid, bromosuccinic acid, α -keto buturic acid, L-alaninamide, D-alanin, L-alalnin, L-alanyl-glycine, L-asparagine, L-aspartic acid, L-glutamic acid, glycyl-L-glutamic acid, L-histidine, hydroxy-L-proline, L-leucine, L-proline, L-pyroglutamic acid, D-serine, L-serine, L-threonine, γ -aminobuturic acid, urocanic acid, inosine, 2-aminoethanol, glycerol, D-glucose-6-phosphate и D,L- α -glycerol phosphate. Не ги користи соединенијата: glycogen, dextrin, i-erythritol, itaconic acid, L-ornithine, L-phenylalanine α -cyclodextrin, N-acetyl-D-glucosamine, N-acetyl-D-galactosamine, adonitol, gentibiose, α -D-lactose, lactulose, maltose, D-melibiose, β -methyl-D-glucoside, D-raffinose, L-rhamnose, D-sorbitol, turanose, xylitol, γ -hydroxybuturic acid, sebacic acid, succinamic acid, glucuronamid, glycyl-L-aspartic acid, thymidine, phenylethylamine, 2,3-butanediol, α -D-glucose-1-phosphate. Реакциите со: L-fucose, D-cellobiose, α -keto valeric acid, uridine и putrescine се варијабилни.

Изолатот S-2.3 покажа дека му припаѓа на видот *Pseudomonas corrugate*, со процент од 99%, индекс на сличност 0,630 и индекс на оддалеченост 5,64. Ги користи следниве соединенија: tween 80, tween 40, L-arabinose, D-arabitol, D-fructose, D-galactose, α -D-glucose, m-inositol, D-mannitol, D-mannose, D-psicose, sucrose, D-trehalose, pyruvic acid methyl ester, succinic acid mono-methyl-ester, acetic acid, cis-aconitic acid, citric acid, formic acid, D-galactonic acid lactone, D-galacturonic acid, D-gluconic acid, D-cellobiose, D-glucosaminic acid, D-glucuronic acid, α -hydroxybutyric acid, β -hydroxybutyric acid, p-hydroxyphenylacetic acid, α -keto glutaric acid, D,L-lactic acid, D,L-carnitine, malonic acid, propionic acid, quinic acid, D-saccharic acid, succinic acid, bromosuccinic acid, L-alaninamide, D-alanin, L-alalnin, L-alanyl-glycine, L-asparagine, L-aspartic acid, L-glutamic acid, glycil-L-glutamic acid, L-histidine, hydroxy-L-proline, L-leucine, L-proline, L-pyroglutamic acid, D-serine, L-serine, L-threonine, γ -aminobuturic acid, urocanic acid, inosine, 2-aminoethanol, glycerol, D-glucose-6-phosphate, uridine и D,L- α -glycerol phosphate. Не ги користи соединенијата: L-fucose, i-erythritol, itaconic acid, L-ornithine, L-phenylalanine α -cyclodextrin, N-acetyl-D-glucosamine, N-acetyl-D-galactosamine, adonitol, gentibiose, α -D- lactose, lactulose, maltose, D-mellibiose, β -methyl-D-glucoside, D-raffinose, L-rhamnose, D-sorbitol, turanose, xylitol, γ -hydroxybuturic acid, sebacic acid, succinamic acid, glucuronamid, glycyl-L-aspartic acid, thymidine, phenylethylamine, 2,3-butanediol, α -D-glucose-1-phosphate. Реакциите со: α -keto valeric acid, α -keto buturic acid, dextrin, glycogen и putrescine се варијабилни.

Изолатот S-2.4 покажа дека му припаѓа на видот *Pseudomonas corrugata*, со процент од 88%, индекс на сличност 0,626 и индекс на оддалеченост 4,33. Ги користи следниве соединенија: tween 80, tween 40, L-arabinose, D-arabitol, D-fructose, D-galactose, α -D-glucose, m-inositol, D-mannitol, D-mannose, D-psicose, sucrose, D-trehalose, pyruvic acid methyl ester, succinic acid mono-methyl-ester, acetic acid, cis-aconitic acid, citric acid, formic acid, D-galactonic acid lactone, D-galacturonic acid, D-gluconic acid, D-glucosaminic acid, D-glucuronic acid, α -hydroxybutyric acid, β -hydroxybutyric acid, p-hydroxyphenylacetic acid, α -keto glutaric acid, D,L-lactic acid, malonic acid, propionic acid, quinic acid, D-saccharic acid, succinic

acid, bromosuccinic acid, L-alaninamide, D-alanin, L-alanin, L-alanyl-glycine, L-asparagine, L-aspartic acid, L-glutamic acid, glycyl-L-glutamic acid, L-histidine, hydroxy-L-proline, L-leucine, L-proline, L-pyroglutamic acid, D-serine, L-serine, L-threonine, γ -aminobutyric acid, urocanic acid, inosine, 2-aminoethanol, glycerol и D,L- α -glycerol phosphate. Не ги користи соединенијата: D,L-carnitine, D-cellobiose, dextrin, D-erythritol, itaconic acid, L-ornithine, L-phenylalanine α -cyclodextrin, N-acetyl-D-glucosamine, D-glucose-6-phosphate, N-acetyl-D-galactosamine, adonitol, gentibiose, α -D-lactose, lactulose, maltose, D-melibiose, β -methyl-D-glucoside, D-raffinose, L-rhamnose, D-sorbitol, turanose, xylitol, γ -hydroxybutyric acid, sebacic acid, succinamic acid, glucuronamid, glycyl-L-aspartic acid, thymidine, phenylethylamine, 2,3-butanediol, α -D-glucose-1-phosphate. Реакциите со: L-fucose, α -keto valeric acid, α -keto butyric acid, glycogen, uridine и putrescine се варијабилни.

Контролните изолати IPVCT 10.3 покажаа 100% сличност со *P. corrugata*, индекс на сличност од 0.833 и индекс на оддалеченост од 0.250. IPVCT 9.1 покажа сличност со *P. corrugata* од 99%, со индекс на сличност од 0.845 и индекс на оддалеченост од 2.24. Изолатот P.m од Турција, исто така, покажа сличност со *P. corrugata* од 100%, но со индекс на сличност од 0.901 и индекс на оддалеченост од 1,47. Изолатот LMG 2595 со 100% покажа дека му припаѓа на видот *Pantoea agglomerans*, со индекс на сличност од 0.562 и индекс на оддалеченост 6,87. LMG 5850 со 99% му припаѓа на *Pseudomonas marginalis*, со индекс на сличност 1 и индекс на оддалеченост 4,41. LMG 5085 му припаѓа на *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* со 83%, со индекс на сличност од 0.541 и индекс на оддалеченост 5.37. LMG 5396 покажа дека му припаѓа со 99% на *Pseudomonas viridiflava*, со индекс на сличност 0,711 и индекс на оддалеченост 4,33. USB 1201 му припаѓа на *Pseudomonas fluorescens* со 100%, со индекс на сличност 0,775 и индекс на оддалеченост 3,38 (Табела 5).

Изолатот LMG 2891, како што се очекуваше, покажа дека му припаѓа на родот *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* со 100%, со индекс на сличност 0,761 и индекс на оддалеченост 3,60. Реагира и ги користи следниве соединенија: dextrin, amygdalin, L-arabinose, arbutin, D-

cellobiose, D-fructose, D-galactose, gentibiose, α -D-glucose, maltose, D-mannitol, D-mannose, palatinose, D-psicose, D-sorbitol, sucrose, D-trehalose, turanose, D-xylose, pyruvic acid methyl ester, L-alaninamid, L-alanin, L-alanyl glycine, L-asparagine, glycerol и adenosine. Не ги користи соединенијата: α -cyclodextrin, β -cyclodextrin, glycogen, inulin, mannan, tween 40, tween 80, N-acetyl-D-glucosamine, N-acetyl- β -D-mannosamine, D-arabitol, L-fucose, D-galacturonic acid, D-gluconic acid, α -D-lactose, lactulose, maltotriose, D-melezitose, D-melibiose, α -methyl-D-galactoside, β -methyl-D-galactoside, 3-methyl glucose, α -methyl-D-glucoside, β -methyl-D-glucoside, α -methyl-D-mannoside, D-raffinose, L-rhamnose, D-ribose, salicin, sedoheptulosan, stachyose, D-tagatose, xylitol, acetic acid, α -hydroxybutyric acid, β -hydroxybutyric acid, γ -hydroxybutyric acid, p-hidroxy phenylacetic acid, α -ketoglutaric acid, α -ketovaleric acid, lactamide, D-lactic acid methyl ester, L-lactic acid, D-malic acid, L-malic acid, succinic acid mono-methyl ester, propionic acid, pyruvic acid, succinamic acid, succinic acid, N-acetyl-L-glutamic acid, D-alanine, L-glutamic acid, glycyl-L-glutamic acid, L-pyroglutamic acid, L-serine, putrescine, 2,3-butanediol, 2-deoxyadenosine, inosine, thymidine, uridine, adenosine-5-monophosphate, thymidine-5-monophosphate, uridine-5-monophosphate, D-fructose-6-phosphate, α -D-glucose-1-phosphate, D-glucose-6-phosphate, D-L- α -glyceric phosphate.

5.9 Генетски карактеристики на изолатите

Од генетските истражувања е направен мултиплекс PCR, за идентификација и раздвојување на *P. corrugata* и *P. mediterranea*. Изолатите Ds-4, Ds-4/1, Ds-4/2, Ds-12, Ds-12/1, Ds-12/2, Ds-13, Ds-13/1, Ds-13/2, S-2.1, S-2.2, S-2.3, S-2.4, IPVCT 9.1 и P.m формираат банд на 600 bp, а IPVCT 10.3 на 1100 bp (Сл. 35 и сл. 36). Останатите изолати даваат неспецифични, или пак, воопшто не даваат амплифицирачки продукти.

5.10 Статистичка обработка на податоците

5.10.1. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis

System – NTSYSpc

Интерпретацијата на резултатот од статистичката обработка на податоците е даден во облик на филогенетско дрво на сличност (Сл. 37).

Сите испитувани изолати од видот *P. mediterranea* и *P. corrugata* се групирани во еден кластер со индекс на сличност 0.937. Во рамките на овој кластер изолатите се поделени на три посродни групи (А, Б, В). Во групата А се наоѓаат контролните изолати IPVCT 10.3, IPVCT 9.1 и P.m со индекс на сличност од 0.958. Во групата Б со индекс на сличност од 0.976 се наоѓаат изолатите Ds-4, Ds-4/1, Ds-4/2, S-2.1, S-2.2, S-2.3 и S-2.4. Во рамките на овој кластер можат да се забележат два подкластера од кои во едниот со индекс на сличност од 0.988 се наоѓаат Ds-4, Ds-4/1, Ds-4/2, S-2.1 и S-2.4, а во другиот подкластер со индекс на сличност 0.994 припаѓаат S-2.2, S-2.3. Во групата В со индекс на сличност од 0.982, припаѓаат изолатите Ds-12, Ds-12/1, Ds-12/2, Ds-13, Ds-13/1 и Ds-13/2.

6. ДИСКУСИЈА

Во текот на последниве неколку години, поточно од 2005 година па наваму, е забележана појава на некроза на стеблената срж кај домотот одгледуван во пластеници и на отворено. Ова заболување кај домотите, најверојатно било присутно и порано, меѓутоа, поради недоволно развиената научно-истражувачка работа во земјава, досега оваа појава не е проучена и не е идентификуван причинителот, односно причинителите.

Во науката, заболувањето кое предизвикува симптоми на некроза на стеблената срж кај домотот, се нарекува “*Tomato Pith Necrosis*” или скратено “TPN”, а можат да го предизвикаат повеќе видови бактерии од родот *Pseudomonas*, и тоа: *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas mediterranea*, *Pseudomonas viridiflava*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas marginalis*, *Pseudomonas cichorii*, или пак, некои други флуоресцентни *Pseudomonads* видови, многу блиски до *Pseudomonas corrugata*.

Резултатите од сопствените истражувања, кои беа направени од 2005 година па до 2009 година, покажаа дека во нашава земја ова заболување го предизвикуваат неколку видови бактерии: *Pseudomonas viridiflava*, *Pseudomonas marginalis* и *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, кои не се вклучени во оваа истражувачка работа, бидејќи се сметаше дека поголемо внимание треба да ѝ се посвети на *Pseudomonas mediterranea*, за која досега нема податоци дека е присутна во Република Македонија. Оваа бактерија за прв пат е идентификувана и детерминирана во оваа истражувачка работа. Истата е идентификувана само во пет медитерански земји: во Италија (Cattara et al., 2000), Шпанија (Lopez et al., 1994), Франција (Cattara et al., 2002), Португалија (Moura et al., 2005) и во Турција (Basim et al., 2005; Sahin et al., 2004).

Изолатите испитувани во оваа теза со шифри Ds-4, Ds-4/1, Ds-4/2, Ds-12, Ds-12/1, Ds-12/2, Ds-13, Ds-13/1, Ds-13/2, S-2.1, S-2.2, S-2.3 и S-2.4 се споредени со неколку контролни изолати од родот *Pseudomonas*, кои причинуваат некроза на стеблената срж кај домотот (IPVCT 10.3, IPVCT 9.1, USB 1201, P.m, LMG 5850, LMG 5085 и LMG 5396), еден изолат од

видот *Clavibacter mshiganensis* subsp. *michiganensis* (LMG 2891) и еден изолат кој му припаѓа на видот *Pantoea agglomerans*, (LMG 2595) којшто многу често се изолира како сапрофит, или заедно со патогените видови, како секундарен паразит а понекогаш при поволни услови може да предизвика и заболување кај некои култури.

Изолацијата на бактериите беше направена на хранлива подлога NA (Klement et al., 1990). Најпрво, беа направени тестовите за грам-реакција, хиперсензибилност на листови од тутун и патогеност на растенија од домати, со цел да се потврди патогеноста на изолатите. Тестот за боењето според грам, покажа дека се работи за грам-негативни бактерии, со што веднаш е исклучена можноста дека се работи за бактерии од видот *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

Откако тестот за хиперсензибилност и патогеност покажа позитивни резултати, направен е тестот за флуоресцентност на подлога Кинг Б, којшто покажа дека се работи за нефлуоресцентни бактерии, со што беше исклучена можноста дека се работи за флуоресцентни *Pseudomonads* видови, кои предизвикуваат некроза на сржта кај доматиот. Но, со тоа не е исклучена можноста дека се работи за бактеријата *Erwinia caratovora* subsp. *caratovora*, којашто, исто така, предизвикува гнилеж, се бои негативно според грам, не флуоресцира на подлога Кинг Б, не поседува цитохром оксидаза, се развива и во аеробни и во анаеробни услови и има пектолитичка активност (Bradbury, 1977; Cother & Sivasthamparam, 1983) (Табела 4). LOPAT тестовите за детерминација на видовите од родот *Pseudomonas* покажаа дека нашиот вид бактерии формираат цитохром оксидаза, не формираат леван, не предизвикуваат гниење на резанки од компир, вршат дехидролиза на аргининот и предизвикуваат хиперсензибилност на листови од тутун. Тестот за оксидазно ферментативната активност покажа дека бактериите се аеробни, а позитивен беше и тестот за активност на уреазата. Сиве овие карактеристики ни овозможија да заклучиме дека се работи за нефлуоресцентни *Pseudomonas* видови и дека истражувањето е на вистинскиот пат да го открие присуството на видот *Pseudomonas corrugata*.

За идентификација на видот од бактериите е направен BIOLOG тест на изолатите, при што е добиен очекуваниот резултат дека се работи за видот *Pseudomonas corrugata*. Меѓутоа, имајќи предвид дека сè до 2002 година видот *P. corrugata* бил поделен на два таксона, 1a и 1b, врз основа на можноста да ги користат соединенијата meso-tartrate, 2-ketogluconate и histamine, при што таксонот 1a кој кореспондира на *P. corrugata*, не ги користи, а таксонот 1b, кој кореспондира на *P. mediterranea*, ги користи овие соединенија, се наметна потребата од дополнителни анализи за да се потврди за која од овие два вида бактерии станува збор. За таа цел, се направени тестови со кои се утврди дека испитуваните изолати ги користат соединенијата meso-tartrate, 2-ketogluconate и histamine, значи фенотипски му припаѓаат на таксонот 1b, односно на видот *Pseudomonas mediterranea*. Истото го потврдивме и со генетските испитувања што ги направивме со помош на мултиплекс PCR амплификација со два типа пражмери, тип I (PC 5/1: 5-CCACAGGACAACATGTCCAC-3 и PC 5/2: 5-CAGGCGCTTTCTGGAACATG-3) и тип II (PC 1/1: 5-GGATATGAGCCAGGTCTTCG-3 и PC 1/2: 5-CGCTCAAGCGCGACTTCAG-3) (Cattara et al., 2000), при што нашите изолати покажаа присуство на амплифицирачки продукт од 600 bp, како и позитивните контроли IPVCT 9.1 и P.m, а изолатот IPVCT 10.3, кој припаѓа на видот *P. corrugata*, покажа присуство на амплифицирачки продукт од 1100 bp.

Направени се тестови за определување на одредени својства на изолатите. Сознанието за тоа како би реагирала оваа бактерија на CuSO_4 и на стрептомицинсулфат, соединенија, кои многу често се користат за сузбивање на бактериските болести, е едно од поважните и покорисни сознанија за практиката. Затоа, во *in vitro* услови е испитано дејството на различни концентрации од CuSO_4 и стрептомицинсулфат во сузбивање на развојот на изолатите. Резултатот покажа дека поефикасен во сузбивањето е стрептомицин сулфатот, којшто, дури и во многу мали количества под 20 $\mu\text{g/ml}$, го сузбива развојот како кај нашите, така и кај изолатите од Италија и Турција. При концентрацијата од 70 $\mu\text{g/ml}$ CuSO_4 , имаше развој на само една колонија кај изолатите Ds-4, Ds-4/1, Ds-4/2, Ds-13, Ds-13/1 и Ds-13/2, поради што истите се подложени на

пораств при концентрација од 75 µg/ml CuSO₄. Резултатот покажа дека оваа концентрација е најефикасна. Кај изолатите Ds-12, Ds-12/1 и Ds-12/2, развојот на колониите, при концентрација од 70 µg/ml CuSO₄, беше намален, но не како кај претходните изолати. Кај изолатите, пак, од Италија и Турција, развојот воопшто не беше намален, што значи дека овие изолати, најверојатно поради честата употреба на бакарсулфат во производството на домати во овие земји, станале значително резистентни. До истиот заклучок дошла и Allipri et al. во 2003 година кај изолатите со потекло од Аргентина. Таа заклучила дека, поради честата употреба на бакарот во производството на домати, изолатите од *P. corrugata* со потекло од Аргентина станале порезистентни на ова соединение.

Изгледот на колониите кај овој вид може да биде многу различен, не само помеѓу изолатите од различни региони, туку и кај изолатите од една иста оранжерија или пластеник (Cattara et al., 2007). Затоа, изгледот на колониите го детерминиравме и го споредивме на различни хранливи подлоги. Како најдобра, за таа цел, се покажа подлогата според Schaad (1980), YDCA која може да биде приготвена со декстроза или глукоза и CaCO₃. Колониите на оваа подлога имаа темнозелено-син пигмент со кремиви назабени рабови и набрана површина. Во однос на изгледот, колониите беа многу слични со контролата од Италија. Според изгледот, бактериските колонии на контролата од Турција беа многу набрани, со портокалово-жолта боја и изгледаа како грутки при прегледот со голо око во петриевката.

Резултатите од BIOLOG тестот покажаа дека сите изолати користат tween 80, tween 40, L-arabinose, D-arabitol, D-fructose, D-galactose, α-D-glucose, m-inositol, D-mannitol, D-mannose, D-psicose, sucrose, D-trehalose, pyruvic acid methyl ester, succinic acid mono-methyl-ester, acetic acid, cis-aconitic acid, citric acid, formic acid, D-galactonic acid lactone, D-gluconic acid, D-glucosaminic acid, α-hydroxybutyric acid, β-hydroxybutyric acid, p-hydroxy phenylacetic acid, α-keto glutaric acid, D,L-lactic acid, malonic acid, propionic acid, D-saccharic acid, succinic acid, bromosuccinic acid, D-alanin, L-alanin, L-alanylglycine, L-asparagine, L-aspartic acid, L-glutamic acid, glycyl-L-glutamic acid, L-histidine, hydroxy-L-

proline, L-leucine, L-proline, L-pyroglutamic acid, L-serine, L-threonine, γ -aminobutyric acid, urocanic acid, inosine, 2-aminoethanol, glycerol и D,L- α -glycerol phosphate. Не можат да ги користат соединенијата: α -cyclodextrin, α -D-lactose, lactulose, maltose, D-melibiose, D-raffinose, L-rhamnose, D-sorbitol, turanose, xylitol, γ -hydroxybutyric acid, sebacic acid, glucil-L-aspartic acid, phenylethylamine, α -D-glucose-1-phosphate. Реакцијата со dextrin-от е варијабилна. Контролите IPVCT 10.3, IPVCT 9.1 and P.m се позитивни, Ds-13, Ds-13/1, Ds-13/2, S-2.1 и S-2.3 покажаа дека нешто послабо го користат, додека пак, изолатите Ds-4, Ds-4/1, Ds-4/2, Ds-12, Ds-12/1, Ds-12/2, S-2.2 и S-2.4 се негативни во однос на можноста да го користат dextrin-от. Glycogen користат сите изолати освен, S-2.2. N-acetyl-D-galactosamine, adonitol, gentibiose и thymidine се негативни за сите изолати, освен за IPVCT 10.3, кој покажа многу слаба реакција. L-fucose слабо користат S-2.2, S-2.4 и IPVCT 10.3. Реакциите со N-acetyl-D-glucosamine и glucuronamid се негативни за изолатите од Македонија, а позитивни за контролите IPVCT 10.3, IPVCT 9.1 и P.m. Реакцијата со D-glucuronic acid е позитивна за изолатите S-2.1, S-2.2, S-2.3, S-2.4 и за контролните изолати IPVCT 10.3, IPVCT 9.1 и P.m. Соединението i-erythritol можат да го користат само контролите од Италија и изолатите Ds-13, Ds-13/1 and Ds-13/2. β -methyl-d-glucoside го користат само S-2.2, Ds-12, Ds-12/1 и Ds-12/2, а itaconic acid само IPVCT 9.1, додека Ds-13, Ds-13/1 и Ds-13/2 покажаа слаба реакција. Различна беше и реакцијата во однос на користењето на succinamic acid што го користат контролите и Ds-12, Ds-12/1 и Ds-12/2. Ниту еден изолат не покажа силна реакција со L-phenylalanine; S-2.1, S-2.2, S-2.3, S-2.4, Ds-4, Ds-4/1, Ds-4/2, IPVCT 10.3 и P.m се негативни, додека останатите изолати покажаа слаба реакција. D-serine го користат сите изолати, освен IPVCT 10.3. Uridin-от го користат сите изолати, со тоа што S-2.1, S-2.2, S-2.4, Ds-4, Ds-4/1, Ds-4/2 и IPVCT 10.3 го користат послабо од останатите. S-2.1, Ds-4, Ds-4/1 и Ds-4/2 не можат да го користат putrescin-от, а S-2.2, S-2.3 и S-2.4 го користат послабо. 2,3-Butanediol го користат само IPVCT 10.3, IPVCT 9.1, а послабо P.m. Само изолатите S-2.2, S-2.3, IPVCT 10.3 и S-2.1 (послаба реакција) покажа дека го користи D-glucose-6-phosphat-от.

Врз основа на сите направени испитувања, можеме да заклучиме дека изолатите од Македонија се различни од контролните со потекло од Италија и Турција. Изолатите од Македонија, добиени од растителен материјал, ги поделивме во три групи, во однос на соединенијата кои можат да ги користат. Во првата група се изолатите Ds-4, Ds-4/1 и Ds-4/2, во втората Ds-12, Ds-12/1 и Ds-12/2, а во третата група припаѓаат Ds-13, Ds-13/1 и Ds-13/2.

Изолатите од првата група не можат да ја користат Д-галактуронската киселина, Л-фенилаланинот и путресцинот, за разлика од изолатите кои им припаѓаат на другите две групи. Исто така, и реакцијата со уридинот, Д,Л-карнитинот, Л-орнитинот, Л-аланинамидот, квинската киселина, α -кето валеријанската киселина и α -кето бутурната киселина е послаба отколку кај другите две групи. Изолатите од втората група се одделени од останатите две, врз основа на нивната способност да ги користат β -метил-Д-глюкозидот и сукцинамската киселина, а изолатите од третата група, врз основа на можноста да ги користат Д-целобиозата, и-еритритолот и нешто послабо да ја користат итаконската киселина. Сите три групи се разликуваат од контролните по неспособноста да ги користат N-acetyl-D-glucosamin-от, D-glucuron-ската киселина, глюкуронамидот и 2,3-бутанедиолот.

Изолатите добиени од почва покажаа голема хетерогеност помеѓу себе во однос на соединенијата кои ги користат и се разликуваа од останатите изолати по тоа што не го користат L-ornithine-от. Изолатите S-2.1 и S-2.3 слабо го користат декстринот, исто како и изолатите од третата група, а изолатите S-2.2 и S-2.4 не го користат, како и изолатите од првата и втората група. Гликогенот не го користи само S-2.2, по што се разликува од сите останати, кои помалку или повеќе го користат. Разлики помеѓу изолатите од почва се појавија и во однос на користењето на D-cellobiose-та, при што само изолатот S-2.4 не покажа дека го користи соединението. L-fucose-та слабо ја користат S-2.2 и S-2.4, додека S-2.1 и S-2.3 не ја користат. B-methyl-D-glucoside користи само изолатот S-2.2, а α -keto valeric acid не го користи само S-2.1, додека останатите го користат многу слабо. D,L-carnitine користат само S-2.2 и S-2.3, а Putrescine не го користи изолатот S-2.1. Разлики помеѓу

изолатите од почва има уште и во однос на D-glucose-6-phosphate, којшто го користат сите изолати, освен изолатот S-2.4.

Статистичката обработка на податоците го потврди она што и се очекуваше, дека изолатите од еден ист регион се најсродни помеѓу себе, со тоа што изолатот од Турција (P.m) е посроден со изолатите од Италија, отколку со испитуваните изолати со потекло од Македонија.

Сите испитувани изолати од Македонија, како изолатите добиени од стебло, така и изолатите добиени од почва, како и позитивните контроли од Италија и Турција, се најсродни со бактеријата *Pseudomonas fluorescens* (USB 1201) од негативните контроли, со што се потврди фактот дека *Pseudomonas corrugata* и *Pseudomonas mediterranea* припаѓаат во групата на *Pseudomonas fluorescens*.

Почвените изолати, според сродноста, се поделени во две групи. Во првата група припаѓаат изолатите S-2.1 и S-2.4, а во втората изолатите S-2.2 и S-2.3.

Испитуваните изолати од Македонија со контролните изолати од Италија и Турција имаат сличност од 93,7%. Истите помеѓу себе се поделени во две групи (група Б и група В). Изолатите Ds-4, Ds-4/1 и Ds-4/2 од групата Б се најслични со изолатите добиени од почва кои и припаѓаат на истата група, со сличност од 97,6%. Во групата В се наоѓаат останатите испитувани изолати со потекло од Македонија кои се изолирани од растенија на домот со сличност од 98,2%.

7. ЗАКЛУЧОК

Врз основа на сите податоци, кои претходно се изнесени, можеме да го донесеме следниов заклучок:

Болеста „Некроза на стеблената срж кај домотот“, во светот позната како “*Tomato Pith Necrosis* - TPN”, е присутна и во Република Македонија кај некои производители од Струмичкиот регион и може да биде предизвикана од фитопатогената бактерија *Pseudomonas mediterranea*. Притоа, може да се каже дека, на глобално ниво, во Република Македонија засега не предизвикува значајни економски штети, додека во одредени земји од Европа и од светот е позната како значаен економски штетник. Бидејќи патогенот којшто ја предизвикува болеста е многу вирулентен и има висока патогена способност, како и можност да ја паразитира и пиперката (*Capsicum annuum*), состојбата треба постојано да се следи и да се контролира, со цел да се спречи нејзиното проширување и да се избегнат поголеми економски штети, посебно во регионите кои се значајни производители на домот и пиперка, како што е и Струмичкиот.

Врз основа на направените лабораториски анализи, може да се заклучи дека меѓу испитуваните изолати, кои му припаѓаат на видот *P. mediterranea*, постојат разлики, односно, во рамките на самиот вид *P. mediterranea*, постои извесна хетерогеност меѓу изолатите.

Ова сознание може да послужи како тема за проучување во иднина.

На крајот, како главен заклучок од оваа истражувачка работа, можеме да изнесеме дека во Република Македонија за прв пат е идентификувана и детерминирана фитопатогената бактерија ***Pseudomonas medditeranea***, како причинител на некроза на стеблената срж кај домотот одгледуван во пластеници, и е потврдено нејзиното присуство во почвата, каде што се одгледуваат заболени домати.

8. ДОДАТОК



Сл. 1 Површина под пластеници во околината на Струмица

Fig. 1 Greenhouse production in the area of Strumica



Слика 2. Венеење на одделни гранки кај растение од домот во фаза на цветање (Моноспитово, мај 2006).

Figure 2. Wilteneing of upper branchies at tomato plant, in the blossom stage (Monospitovo, May 2006).



Слика 3. Почеток на сушење и свиткување на листовите кон внатрешноста кај растение од домати, сорта „беле“ (Просениково, јуни 2005).

Figure 3. Beginning of wilting and rolling of the leafs at tomato plant, variety „Bele“ (Posenikovo, June 2005).



Слика 4. Отсуство на симптоми на плодот кај домати, сорта „беле“ (Просениково, јуни 2005).

Figure 4. Absent of symptoms on fruit at tomato plant, variety „bele“ (Prosenikovo, june 2005).



Слика 5. Сушење на листовите кај домати, сорта „беле“, во фаза на зреење и намален квалитет на плодовите (Просениково, јуни 2005).

Figure 5. Wiltning of leafs at tomato plant variety „bele“, in the maturing stage, and decrising quality of the fruit (Prosenikovo, june 2005).



Слика 6. Некроза на сржта на стеблото кај домат, сорта „магнус“ (Куклиш, мај 2006).

Figure 6. Pith necrosis of the steem at tomato plant variety „magnus“ (Kuklish, may 2006).



Слика 7. Некроза на сржта на стебло од домат, сорта „беле“ (Просениково, јуни 2006).

Figure 7. Pith necrosis of tomato, variety „bele“ (Prosenikovo, june 2006).



Слика 8. Некроза на сржта и венење на листовите и гранките кај домат, сорта „беле“ (Просениково, јуни 2005).

Figure 8. Pith necrosis and wilting of leafs and branchies at tomato plant, variety „bele“ (Prosenikovo, june 2005).



Слика 9. Отсуство на симптоми на плодот и присуство на симптоми на стеблото, гранките и листовите кај домати, сорта „беле“ (Просениково, јуни 2005).

Figure 9. Epsence of symptoms at the fruit, and presence of symptoms at steam, branchies and leafs of tomato plant, variety „bele“ (Prosenikovo, june 2005).



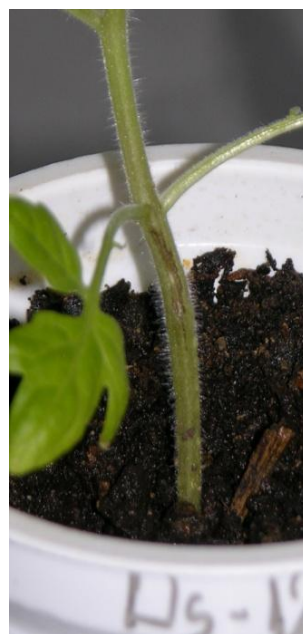
Слика10. Реакција на хиперсензибилност на листови од тутун.

Figure 10. Hypersensitive reaction at tobacco plant.



Слика 11. Венеење на растение од домат, сорта „воловско срце“, инокулиран со изолатот Ds-4.

Figure 11. Wiltening of tomato plant, variety „ox heart“, inoculate with the strain Ds-4.



Слика 12. Појава на лезии и адвентивни коренчиња на стеблото кај растение од домат, сорта „воловско срце“, инокулирано со изолатот Ds-12.

Figure 12. Occurrence of lesions, and adventive roots on the steem of tomato plant, variety „ox heart“, inoculate with the strain Ds-12.



Слика 13. Венеење на гранките и истенчување на стеблото кај растение од домати, сорта „воловско срце“, инокулирано со изолатот Ds-13.

Figure 13. Wiltening of the branchies, and tining of the steem on tomato plant, variety „ox heart“, inoculate with the strain Ds-13.



Слика 14. Присуство на симптоми кај растение од домати, сорта „воловско срце“, кај позитивната контрола IPVCT 9.1 од Италија.

Figure 14. Presence of symptoms at tomato plant, variety of „ox heart“, on the positive control IPVCT 9.1, from Italy.



Слика 15. Отсуство на симптоми кај негативната контрола кај растение од домати, сорта „воловско срце“.

Figure 15. Absence of symptoms on the negative control, at tomato plant, variety of „ox heart“.



Слика 16. Венеење на врвните гранки кај растение од домати, сорта „беле“, инокулиран во аксилот со изолатот Ds-4.

Figure 16. Wiltening of the upper part of young tomato plant, variety „Bele“, inoculate in the axil of the plant, with the strain Ds-4.



Слика 17. Сушење на растение од домати сорта „беле“, инокулиран во аксилот со изолатот Ds-4.

Figure 17. Dying of tomato plant variety of „bele“, inoculate in the axil of the plant, with the strain Ds-4.



Слика 18. Симптом на венење на гранката кај домати, сорта „беле“, инокулиран со позитивната контрола IPVCT 9.1 од Италија.

Figure 18. Symptom of branch wilting at tomato plant, variety „bele“, inoculate with the positive control IPVCT 9.1, from Italy.



Слика 19. Отсуство на симптоми кај негативната контрола кај растение од домати, сорта „беле“.

Figure 19. Absence of the symptoms on the negative control at tomato plant, variety „bele“.



Слика 20. Прекршување на стеблото кај растение од домати, сорта „волоско срце“, инокулирано со реизолатот RDs-4.

Figure 20. Breakening of the steem at tomato plant, variety „ox heart“, inoculate with the reisolate Ds-4.



Слика 21. Појава на кафеави лезии на стеблото кај домати, сорта „волоовско срце“, инокулиран со реизолатот RDs-13.

Figure 21. Occurrence of brown lesions on the steem of tomato plant, variety of „ox heart“, inoculate with the reisolat RDs-13.



Слика 22. Вениење на целото растение кај домати, сорта „волоовско срце“, инокулиран со реизолатот RDs-4.

Figure 22. Wilteneing of tomato plant, variety of „ox heart“, inoculate with the reisolat RD-4.



Слика 23. Сушење на растение од домати, сорта „воловско срце“ инокулиран со позитивната контрола LMG 5085.

Figure 23. Wiltning and dying of tomato plant, variety of „ox heart“, inoculate with the positive control LMG 5085.



Слика 24. Отсуство на симптоми кај негативната контрола, кај растение од домати, сорта „воловско срце“, инокулиран со дестилирана вода.

Figure 24. Epsence of the symptoms on the negative control at tomato plant, variety of „ox heart“, inoculate with destile water.



Слика 25. Изглед на колонии под бинокулар од изолатот Ds-4, одгледувани на хранлива подлога NAS.

Figure 25. Colonies of the isolate Ds-4, grown on nutrient medium NAS, observed under binocular.



Слика 26. Изглед на колонија под бинокулар од изолатот IPVCT 10.3, одгледувани на хранлива подлога NAS.

Figure 26. Colonia from the isolate IPVCT 10.3, grown on nutrient medium NAS, observed under binocular.



Слика 27. Изглед на колонија од изолатот Ds-12, одгледувана на хранлива подлога NAS и набљудувана под бинокулар.

Figure 27. Colonia from the isolate Ds-12, grown on nutrient medium NAS, observed under binocular.



Слика 28. Изглед на колонија од изолатот LMG 5396, одгледувана на хранлива подлога NAS и набљудувана под бинокулар.

Figure 28. Colonia from the isolate LMG 5396, grown on nutrient medium NAS, observed under binocular.



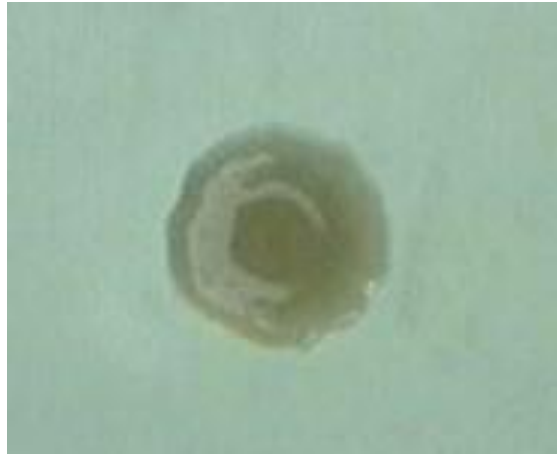
Слика 20. Изглед на колонија под бинокулар од изолатот Ds-4, одгледувана на хранлива подлога NA.

Figure 20. Colonia from the isolate Ds-4 grown, on nutrient medium NA, observed under binocular.



Слика 30. Изглед на колонија под бинокулар од изолатот IPVCT 10.3, одгледувана на хранлива подлога NA.

Figure 30. Colonia from the isolate IPVCT 10.3, grown on nutrient medium NA, observed under binocular.



Слика 31. Изглед на колонија под бинокулар од позитивната контрола на изолатот P.m од Турција, одгледувана на хранлива подлога NA.

Figure 31. Colonia from the positive control P.m from Turkey, grown on nutrient medium NA, observed under binocular.



Слика 32. Изглед на колонија под бинокулар од позитивната контрола од изолатот IPVCT 9.1, одгледувана на хранлива подлога NA.

Figure 32. Colonia from the positive control IPVCT 9.1, grown on nutrient medium NA, observed under binocular.



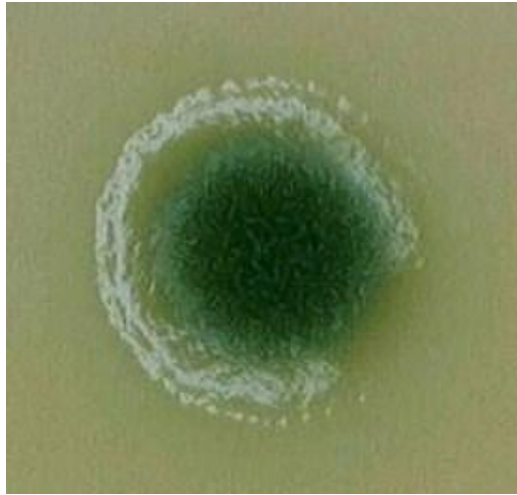
Слика 33. Изглед на колонии под бинокулар од изолатот LMG 5396, одгледувани на хранлива подлога NA.

Figure 33. Colonia from the isolate LMG 5396, grown on nutrient medium NA, observed under binocular.



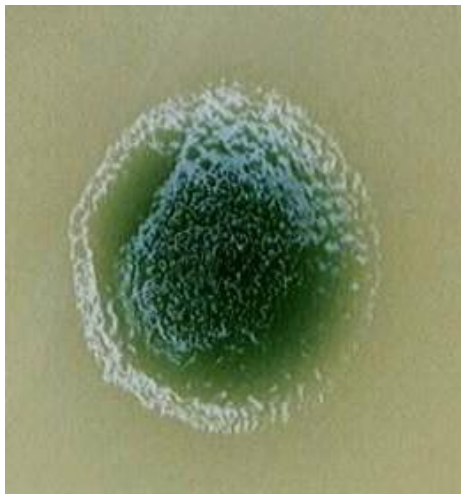
Слика 34. Изглед на колонии под бинокулар од изолатот LMG 5850, одгледувани на хранлива подлога NA.

Figure 34. Colonia from the isolate LMG 5850, grown on nutrient medium NA, observed under binocular.



Слика 35. Изглед на колонија под бинокулар од изолат Ds-4, одгледувана на хранлива подлога YDCA.

Figure 35. Colonia from the isolate Ds-4, grown on nutrient medium YDCA, observed under binocular.



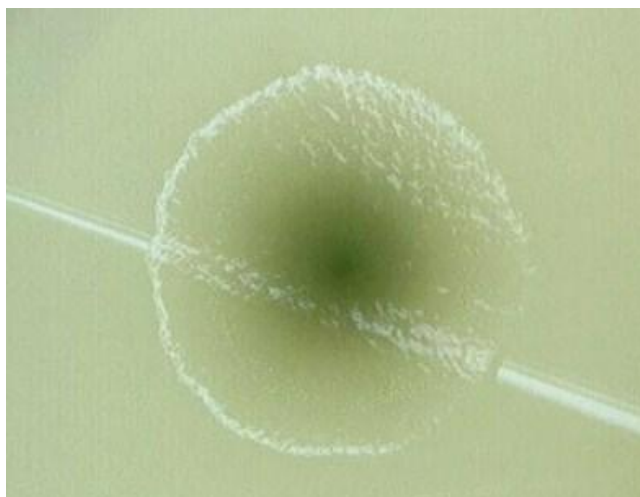
Слика 36. Изглед на колонија од изолат Ds-12, одгледувана на хранлива подлога YDCA под бинокулар.

Figure 36. Colonia from the isolate Ds-12, grown on nutrient medium YDCA, observed under binocular.



Слика 37. Изглед на колонија под бинокулар од контролниот изолат IPVCT 9.1, одгледувана на хранлива подлога YDCA.

Figure 37. Colonia from the isolate Ds-12, grown on nutrient medium YDCA, observed under binocular.



Слика 38. Изглед на колонија под бинокулар од реизолатот RDs-4, одгледувана на хранлива подлога YDCA.

Figure 38. Colonia from the reisolat RDs-4, grown on nutrient medium YDCA, observed under binocular.

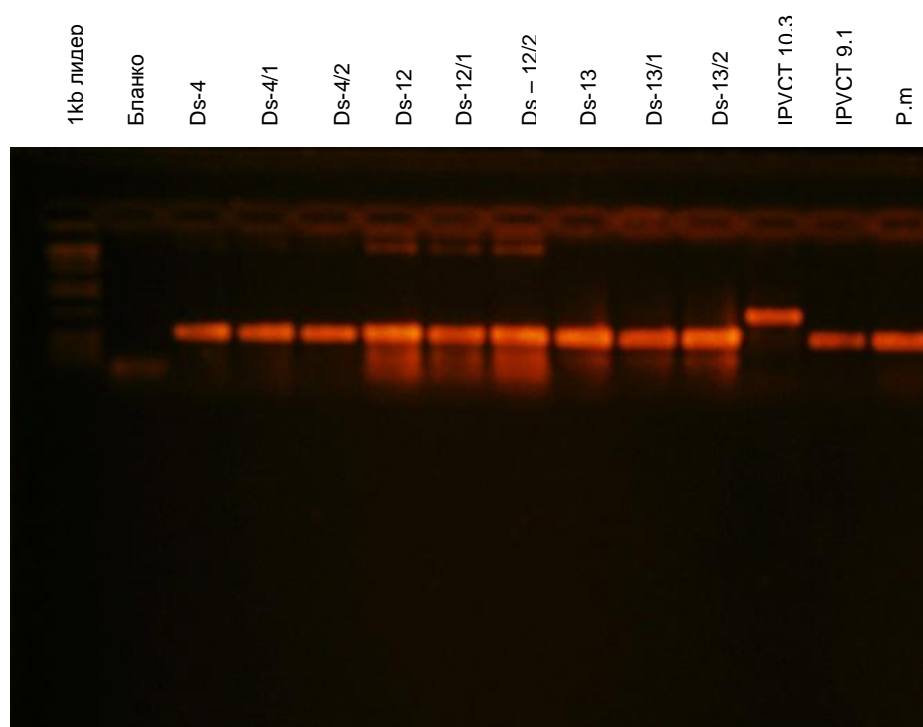


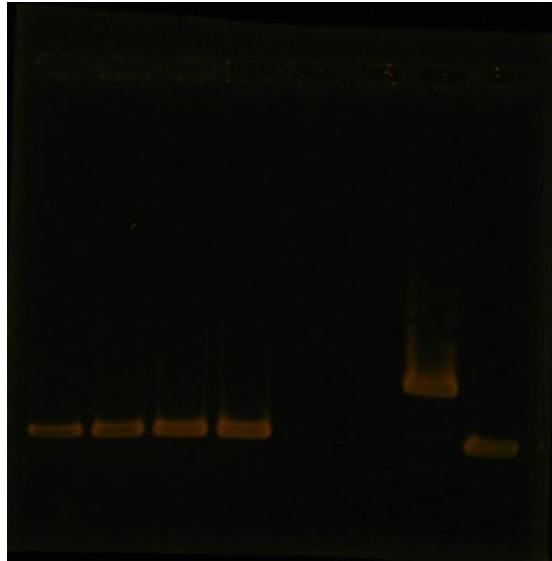
Слика 39. Изглед на колонии од мутантен и немутантен тип кај изолатот Ds-12, одгледувани на хранлива подлога YDCA, набљудувани под микроскоп.

Figure 39. Colonia from mutant, and nonmutant type of the isolate Ds-12, grown on nutrient medium YDCA, observed under binocular.

Слика 35. Мултиплекс PCR за *P. corrugata* и *P. mediterranea*. Линија 1: 1Kb DNA ladder; линија 2: Негативна контрола без DNA; линија 3: Ds-4; линија 4: Ds-4/1; линија 5: Ds-4/2, линија 6: Ds-12; линија 7: Ds-12/1; линија 8: Ds-12/2; линија 9: Ds-13; линија 10: Ds-13/1; линија 11: Ds-13/2; линија 12: PVCT 10.3; линија 13: PVCT 9.1; линија 14: P.m; линија 15: LMG 2595; линија 16: LMG 5850; линија 17: LMG 5085; линија 18: LMG 5396; линија 19: USB 1201; линија 20: LMG 2981; линија 21: 1Kb DNA ladder.

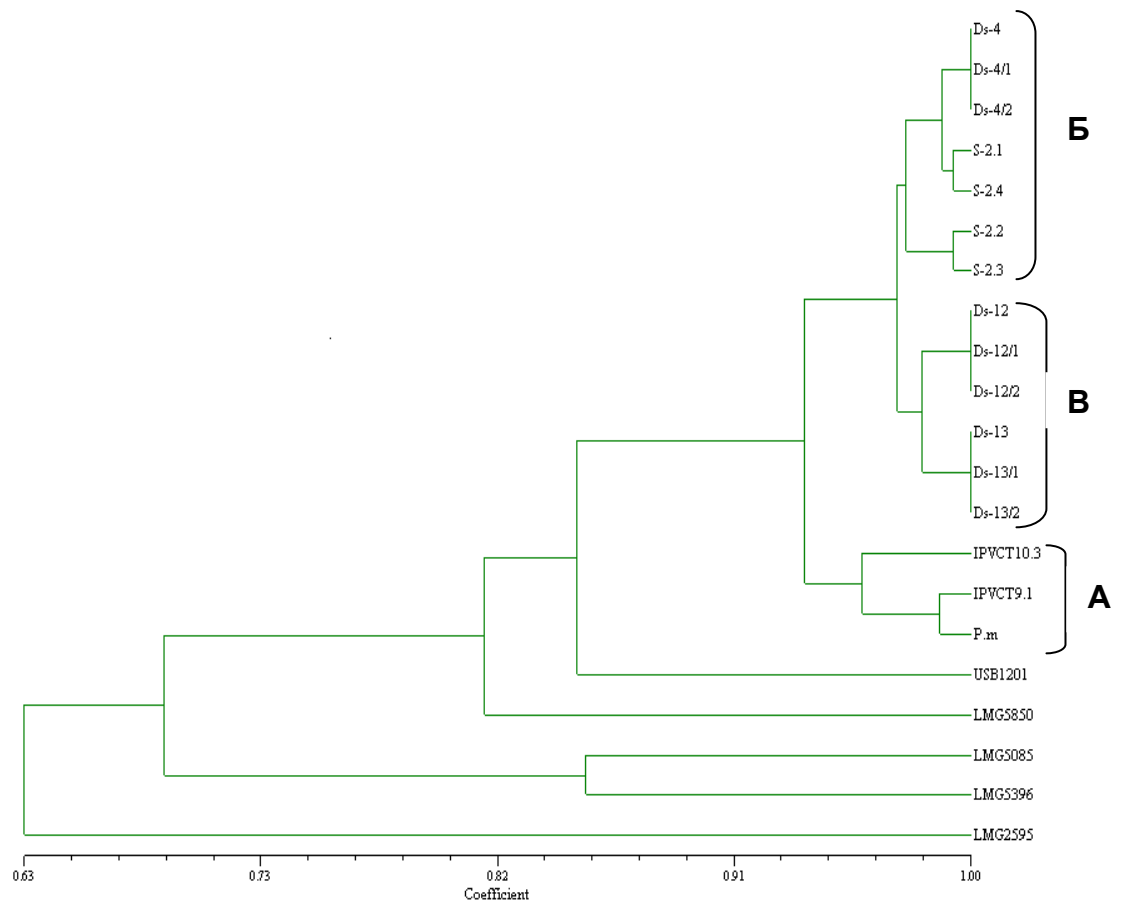
Figure 35. Multiplex PCR for *P. corrugata* and *P. mediterranea*. Line 1: 1Kb DNA ladder; Line 2: Negative control without DNA; Line 3: Ds-4; Line 4: Ds-4/1; Line 5: Ds-4/2, Line 6: Ds-12; Line 7: Ds-12/1; Line 8: Ds-12/2; Line 9: Ds-13; Line 10: Ds-13/1; Line 11: Ds-13/2; Line 12: IPVCT 10.3; Line 13: IPVCT 9.1; Line 14: P.m; Line 15: LMG 2595; Line 16: LMG 5850; Line 17: LMG 5085; Line 18: LMG 5396; Line 19: USB 1201; Line 20: LMG 2981; Line 21: 1Kb DNA ladder.





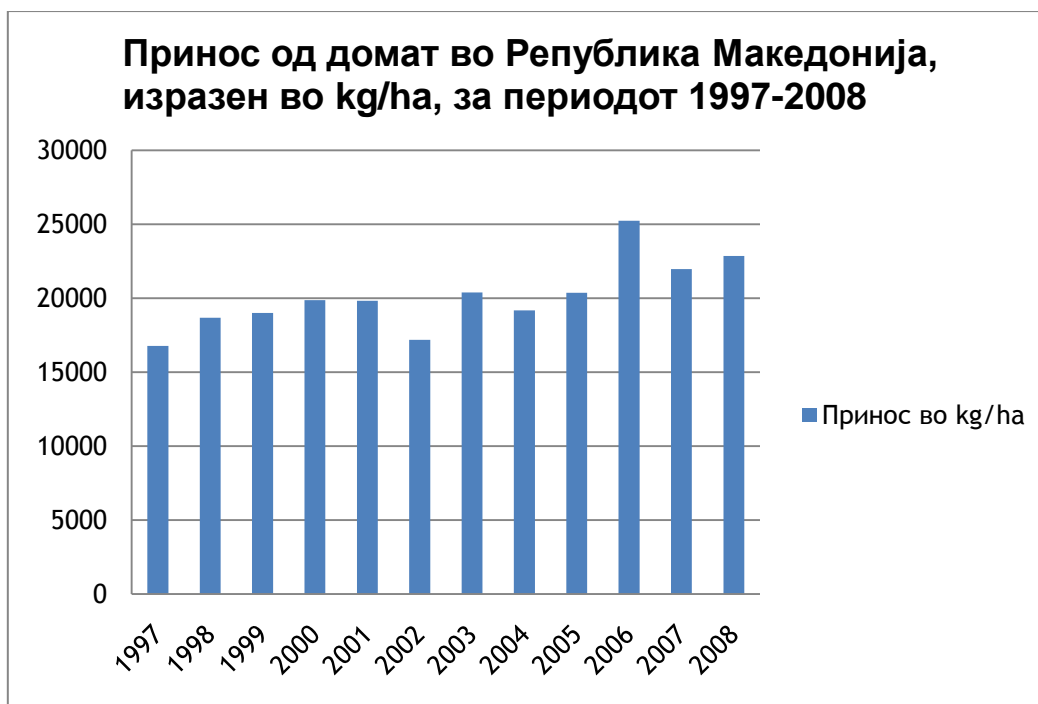
Слика 36. Мултиплекс PCR за *P. corrugata* и *P. mediterranea*. Линија 1: 1Kb DNA ladder; линија 2: Негативна контрола без DNA; линија 3: S-2.1; линија 4: S-2.2; линија 5: S-2.3; линија 6: S-2.4.

Figure 36. Multiplex PCR for *P. corrugata* and *P. mediterranea*. Line: 1, 1 Kb DNA ladder; Line 2: Negative control without DNA; Line 3: S-2.1; Line 4: S-2.2; Line 5: S-2.3; Line 6: S-2.4.



Слика 37. Филогенетско стебло на сличност на испитуваните изолати, според методата на UPGM и Dice коефициент.

Figure 37. Phylogenetic tree for similarity of the investigated isolates according to UPGM method and coefficient of Dice.



Графикон 1. Графички приказ на принос од домат изразен во kg/ha, за периодот од 1997-2008 година во Република Македонија.

Graffic 1. Graffic view of tomato yield production in Macedonia (kg/ha), for the period 1997 – 2008, in Republic of Macedonia.

Табела 1. Преглед на локации кај кои се забележани симптомите во периодот од 2005 до 2008 година.

Table 1. Review of locations where symptoms are observed, during the period from 2005 – 2008 year.

Место	Култура	Сорта	Година
Просениково	<i>Lucopersicon esculentum</i>	„беле“	јуни 2005
Моноспитово	<i>Lucopersicon esculentum</i>	„беле“	мај 2006
Куклиш	<i>Lucopersicon esculentum</i>	„магнус“	мај 2006
Просениково	<i>Lucopersicon esculentum</i>	„беле“	мај 2006
Пиперево	<i>Lucopersicon esculentum</i>	„магнус“	април 2007
Моноспитово	<i>Lucopersicon esculentum</i>	„беле“	април 2007
Куклиш	<i>Lucopersicon esculentum</i>	„магнус“	април 2007
Просениково	<i>Lucopersicon esculentum</i>	„беле“	април 2007
Ерџелија	<i>Lucopersicon esculentum</i>	„пинк рајп“	септември 2007
Куклиш	<i>Lucopersicon esculentum</i>	„магнус“	март 2008
Просениково	<i>Lucopersicon esculentum</i>	„беле“	март 2008
Пиперево	<i>Lucopersicon esculentum</i>	„магнус“	март 2008
Моноспитово	<i>Lucopersicon esculentum</i>	„беле“	март 2008

Табела 2. Преглед на изолатите проучувани во оваа теза

Table 2. Review of the isolates in this study

Шифра Code	Вид Variety	Домаќин Host	Потекло Country	Година Year
Ds - 4	<i>P. mediterranea</i>	<i>L. esculentum</i>	Македонија	2005
Ds – 4/1	<i>P. mediterranea</i>	<i>L. esculentum</i>	Македонија	2005
Ds – 4/2	<i>P. mediterranea</i>	<i>L. esculentum</i>	Македонија	2005
Ds - 12	<i>P. mediterranea</i>	<i>L. esculentum</i>	Македонија	2005
Ds – 12/1	<i>P. mediterranea</i>	<i>L. esculentum</i>	Македонија	2005
Ds – 12/2	<i>P. mediterranea</i>	<i>L. esculentum</i>	Македонија	2005
Ds - 13	<i>P. mediterranea</i>	<i>L. esculentum</i>	Македонија	2005
Ds – 13/1	<i>P. mediterranea</i>	<i>L. esculentum</i>	Македонија	2005
Ds – 13/2	<i>P. mediterranea</i>	<i>L. esculentum</i>	Македонија	2005
S-2.1	<i>P. mediterranea</i>	почва	Македонија	2009
S-2.2	<i>P. mediterranea</i>	почва	Македонија	2009
S-2.3	<i>P. mediterranea</i>	почва	Македонија	2009
S-2.4	<i>P. mediterranea</i>	почва	Македонија	2009
PVCT 10.3	<i>P. corrugata</i>	<i>L. esculentum</i>	Италија	-
PVCT 9.1	<i>P. mediterranea</i>	<i>L. esculentum</i>	Италија	-
P.m	<i>P. mediterranea</i>	<i>L. esculentum</i>	Турција	2004
LMG 2891	<i>C.michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	<i>L. esculentum</i>	Унгарија	1981
LMG 2595	<i>P. agglomerans</i>	<i>Alium cepa</i>	Ј. Африка	1980
LMG 5085	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	<i>Ph. vulgaris</i>	Нов Зеланд	1983
LMG 5850	<i>P. marginalis</i>	<i>C. endivia</i>	САД	1984
LMG 5396	<i>P. viridiflava</i>	<i>L. esculentum</i>	Нов Зеланд	1983
USB 1201	<i>P. fluorescence</i>	<i>L. esculentum</i>	Италија	2005

Табела 3. Лопат и грам-карактеристики на изолатите од оваа магистерска теза.

Табле 3. Lopat and Gram characteristics of the isolates investigated in this study.

	Грам Gram	Леван Levan	Оксидаза Oxidase	Пектолитичка активност Pectolitic ability	Аргинин Arginine	HR/Тутун HR/Tobacco
Ds-4	-	-	+	-	+	+
Ds-4/1	-	-	+	-	+	+
Ds-4/2	-	-	+	-	+	+
Ds-12	-	-	+	-	+	+
Ds-12/1	-	-	+	-	+	+
Ds-12/2	-	-	+	-	+	+
Ds-13	-	-	+	-	+	+
Ds-13/1	-	-	+	-	+	+
Ds-13/2	-	-	+	-	+	+
S-2.1	-	-	+	-	+	+
S-2.2	-	-	+	-	+	+
S-2.3	-	-	+	-	+	+
S-2.4	-	-	+	-	+	+
UPGM 10.3	-	-	+	-	+	-
UPGM 9.1	-	-	+	-	+	-
P.m	-	-	+	-	+	-
LMG 5085	-	+	-	-	+	+
LMG 5396	-	-	-	+	+	+
LMG 5850	-	-	+	+	+	+
USB 1201	-	+	+	-	+	-
LMG 2595	-	-	-	-	-	-
LMG 2891	+	-	-	-	-	+

+ / позитивна реакција

- / негативна реакција

+ / positive reaction

- / negative reaction

Табела 4. Патогени, биохемиско-физиолошки и одгледувачки карактеристики на испитуваните изолати, изолирани од симптоматични растенија, почва и контролните изолати.

Table 4. Pathogenic, biochemical – phylogenetic and growth characteristics of the investigated isolates from tomato plants showing symptoms of TPN, from soil and control isolates.

PCR	Biolog test	Ds-4	Ds-4/1	Ds-4/2	Ds-12	Ds-12/1	Ds-12/2	Ds-13	Ds-13/1	Ds-13/2	S-1	S-2	S-3	S-4	IPVCT 10.3	IPVCT 9.1	P.m	LMG 2595	LMG 5850	LMg 5085	LMG 5396	USB 1201	
		Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
		HR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
		Oxidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
		Fluorescence	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	
		Levan	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	
		Pectolitic activity	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	
		Arginine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	
		Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
		O/F test	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	
		Gelatine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
		Starch	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
		5% NaCl	nd	nd	nd	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
		7% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
		Ammonium	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
		H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	
		Nitrate reduction	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
		Indole	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd	-	-	-	+	
		Aesculine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	
		Urease	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
		PHB	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
		4 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
		37 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
		41 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
		meso-tartrate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
		2ketogluconate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
		Histamine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
			P. corrugata	P. corrugata	P. corrugata	P. corrugata	P. corrugata	P. corrugata	P. corrugata	P. corrugata	P. corrugata	P. corrugata	P. corrugata	P. corrugata	P. corrugata	P. corrugata	P. corrugata	P. corrugata	Cl. m. m	P. marginalis	P. syringae	P. viriediflava	P. fluorescens
			P.mediterranea	P.mediterranea	P.mediterranea	P.mediterranea	P.mediterranea	P.mediterranea	P.mediterranea	P.mediterranea	P.mediterranea	P.mediterranea	P.mediterranea	P.mediterranea	P.mediterranea	P. corrugata	P.mediterranea	P.mediterranea					

+ позитивна реакција;

+ positive reaction;

- негативна реакција;

- negative reaction;

nd - слабо позитивна реакција;

nd – week reaction;

Cl.m.m- *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense*;

Табела 4а. Ефикасност на CuSO_4 и *Streptomycinsulphate* во сузбивање на растот на колониите од испитуваните изолати, во *in vitro* услови.

Table 4a. CuSO_4 and *Streptomycinsulphate* efficacy, in growth suppression, of the investigated isolates, in *in vitro* conditions.

	Ds-4	Ds-4/1	Ds-4/2	Ds-12	Ds-12/1	Ds-12/2	Ds-13	Ds-13/1	Ds-13/2	S-1	S-2	S-3	S-4	IPVCT 10.3	IPVCT 9.1	P.m	LMG 2595	LMG 5850	LMG 5085	LMG 5396	USB 1201
CuSO_4 , 200 $\mu\text{g/l}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CuSO_4 , 100 $\mu\text{g/l}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
CuSO_4 , 75 $\mu\text{g/l}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CuSO_4 , 70 $\mu\text{g/l}$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
CuSO_4 , 50 $\mu\text{g/l}$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Streptomycine 200 $\mu\text{g/l}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Streptomycine 100 $\mu\text{g/l}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Streptomycine 70 $\mu\text{g/l}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Streptomycine 50 $\mu\text{g/l}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Streptomycine 20 $\mu\text{g/l}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Streptomycine 15 $\mu\text{g/l}$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Табела 5. BIOLOG карактеристики на испитуваните изолати.

Table 5. BIOLOG characteristics of the investigated isolates.

	Ds-4	Ds-4/1	Ds-4/2	Ds-12	Ds-12/1	Ds-12/2	Ds-13	Ds-13/1	Ds-13/2	S - 2.1	S-2.2	S-2.3	S-2.4	PVCT 10.3	PVCT 9.1	P.m	LMG 2595	LMG 5850	LMG 5085	LMG5396	USB 1201
α -Cyclodextrin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dextrin	-	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	nd	-	+	+	+	+	-	-	-	-
Glycogen	nd	nd	nd	+	+	+	+	+	+	+	-	nd	nd	+	+	+	-	-	-	-	nd
Tween 40	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
Tween 80	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
N-Acetyl-D-Galactosamine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd	-	-	-	-	-	-	-
N-Acetyl-D-Glucosamine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd	-	-	-	-	-	-	+
L-Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
D-Arabitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
D-Cellobiose	-	-	-	-	-	-	+	+	+	nd	nd	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-
i-Erythritol	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	nd	+	-	+
D-Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
L-Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd	-	nd	nd	-	-	-	-	-	-	-
D-Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gentiobiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd	-	-	-	-	-	-	-
α -D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
m-Inositol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
α -D-Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactulose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
D-Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-

β-Methyl-D-Glucoside	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
D-Psicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	n d	-	-	+	-
D-Raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
D-Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
Sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	n d	+	-	-
D-Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Turanose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xylitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Pyruvic Acid Methyl Ester	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	n d	-	+	+
Succinic Acid Mono-Methyl-Ester	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acetic Acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	n d	+	+	n d	+
Cis-Aconitic Acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citric Acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	n d	+
Formic Acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Galactonic Acid Lactone	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
D-Galacturonic Acid	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Gluconic Acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Glucosaminic Acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
D-Glucuronic acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
α-Hydroxybutyric Acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
β-Hydroxybutyric Acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
γ-hydroxybutyric Acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
p-HydroxyPhenylacetic Acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
Itaconic Acid	-	-	-	-	-	-	n d	n d	n d	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+
α-Keto Butyric Acid	n d	n d	n d	+	+	+	+	+	+	n d	+	n d	n d	+	+	+	+	-	-	-	+
α-KetoGlutaric Acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
α-Keto Valeric Acid	n d	n d	n d	+	+	+	+	+	+	-	n d	n d	n d	+	+	+	+	-	+	-	+
D,L-Lactic Acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Malonic Acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
Propionic Acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
Quinic acid	n d	n d	n d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
D-Saccharic acid-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Sebacic Acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Succinic Acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Bromosuccinic Acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Succinamic Acid	-	-	-	n d	n d	n d	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	n d	+
Glucuronamid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
L-Alaninamid	n	n	n	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+

Табела 6. Основни тестови за детерминација на бактериите од родот *Pseudomonas*.

Table 6. Basic tests for identification of bacteria from *Pseudomonas* spp.

	<i>Pseudomonas</i> spp.		<i>Erwinia</i>	<i>Pantoea</i>	<i>Clavibacter</i>
	<i>FTPNP</i>	<i>NFTPNP</i>			
Грам Gram	-	-	-	-	+
Оксидаза Oxidase	V ^a	+	-	-	-
Аеробен развој Aerobic growth	+	+	+	+	+
Анаеробен развој Anaerobic growth	-	-	+	+	-
Флуоресцентност Fluorescence	+	-	-	-	-
Пектолитичка активност Pectolitic activity	V ^b	-	+	-	-
Уреаза Urease	-	+	-	-	-
Жолти/портокалови колонии на YDCA Yellow/orange colonies on YDCA	-	-	-	+	+

FTPNP- Флуоресцентни видови од родот *Pseudomonas*, кои предизвикуваат некроза на стеблената срж.

NFTPNP- Нефлуоресцентни видови од родот *Pseudomonas*, кои предизвикуваат некроза на стеблената срж.

^a *P.marginalis*, *P. cichorii* и *P. fluorescence* се позитивни, додека пак, *P.viridiflava* и *P.syringae* pv. *syringae* се негативни

^b *P.marginalis* и *P.viridiflava* се позитивни

FTPNP- Fluorescent Tomato Pith Necrosis *Pseudomonas*

NFTPNP- Nonfluorescent Tomato Pith Necrosis *Pseudomonas*

^a *P.marginalis*, *P. cichorii* and *P. fluorescence* are positive, *P.viridiflava* and *P.syringae* pv. *syringae* are negative.

^b *P.marginalis* and *P.viridiflava* are positive.

9. КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА

- Abada, E.A.** (2006). Nitrogenase activity of *Pseudomonas corrugata* isolated from Egyptian lettuce. *Journal of Biological Sciences* 6 (1): 198-199.
- Achouak, W., Thie'ry, M., Roubaud, P. and Heulin, T.** (2000). Impact of crop management on intraspecific diversity of *Pseudomonas corrugata* in bulk soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 31: 11-19.
- Aysan, Y.** (2001). Bacterial stem necrosis of tomato in the greenhouse in the eastern Mediteranean region of Turkey. 11th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union and 3rd Congress of the Sociedade Portuguesa de Fitopatologia. Evora, Portugal 17-20 September, 301-303.
- Arsenijević, M.** (1971). Bakteriozna trulež nekih povrtarskih kultura. *Savremena poljoprivreda* 7-8: 85-96. Novi Sad.
- Arsenijević, M.** (1978). Erwinia soft rot bacteria originating from pepper and tomato fruits. 4th International Conference for Pathogenic bacteria – Angers, France.
- Arsenijević, M.** (1988). Bakterioze biljaka. Naučna knjiga, Beograd.
- Arsenijević, M.** (1994). Karakteristike bakterije *Pseudomonas* sp., patogena paradajza. *Zaštita bilja*, br. 210, Beograd.
- Алаџајков, Л.** (1963). Градинарство (специјален дел). Учебник за средните земјоделски училишта. Народна задруга, Скопје, 156-157.
- Alivaziatos, A.S.** (1984). Aetiology of tomato pith necrosis in Greece. *Proceedings of the Second Working Group on Pseudomonas syringae pathovars.* Greece: Sounion, 55-57.
- Alippi, A. M., Ronco, B. L. and Alippi, H.E.** (1993). Tomato pith necrosis caused by *Pseudomonas corrugata* in Argentina. *Plant Disease* 77: 428.
- Alippi, A. M., Wolcan, S. and Dal Bo, E.** (1999). First report of bacterial leaf necrosis of basil caused by *Pseudomonas viridiflava* in Argentina. *Plant Disease* 83: 876.
- Alippi, A. M. Dal Bo, E., Ronco, L. B., Lopez, M. V., Lopez, A.C. and Aguilar, O.M.** (2003). *Pseudomonas* populations causing pith necrosis of

tomato and pepper in Argentina are highly diverse. Plant Pathology 52, 287-302.

Ashby, R.D., Solaiman, D.K.Y. and Foglia, T.A. (2003). Bacterial poly(hydroxyalkanoate) polymer production from the biodiesel co-product stream. J. Polymer Environ. 12: 105-112.

Ashby, R.D., Solaiman, D.K.Y. and Foglia, T.A. (2005): Synthesis of short-medium-chain-length poly (hydroxyalkanoate) blends by mixed culture fermentation of glycerol. Biomacromolecules 6: 2106-2112.

Barishnikova, L.M., Grishchenkov, V.G., Arinbasarov, M.U., Shkidchenko, A.N. and Boronin, L.M. (2001). Biodegradation of oil products by individual degrading strains and their associations in liquid media. Appl. Biochem. Microbiol. 37: 463-468.

Barnett, S., Alami, Y., Singleton, I. and Ryder, M. (1999). Diversification of *Pseudomonas corrugata* strain 2140 produces new phenotypes which cross taxonomic boundaries according to GC-Fame, BIOLOG and inhibition assays. Can. J. Microbiology 45: 287-298.

Basim, H., Basim, E., Yilmaz, S., Ilkucan, M. (2005). First report of pith necrosis of tomato caused by *Pseudomonas mediterranea* in Turkey. Plant Pathology 54: 240.

Bell, C. R., Dickie, G. A., Chan, J. W. Y. F. (1995). Variable response of bacteria isolated from grapevine xylem to control grape crown gall disease in plant. Am. J. Enol. Vitic. 46: 499-508.

Bennik, M.H.J., Vorstman, W., Smid, E. J. and Gorris, L.G. (1998). The influence of oxygen and carbon dioxide on the growth of prevalent Enterobacteriaceae and *Pseudomonas* species isolated from fresh and modified atmosphere stored vegetables. Food Microbiology 15: 459-469.

Bradbury, J.F. (1977). *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. C.M.I. Description of Pathogenic fungi and bacteria. No 552, Comm. Mycol. Instit., Kew.

Bradbury, J.F. (1981). *Pseudomonas cichorii*. C.M.I. Description of Pathogenic fungi and bacteria. No 696, Comm. Mycol. Instit., Kew.

- Брсаковски, В.** (1994). Појава учестеност и сузбивање на болести кај домати и пиперки во А.К. „Лозар“, Т. Велес. Симпозиум „Нови технологии во градинарството и цвеќарството“, 323-327.
- CABI.** (2006). Crop Protection Compendium. Wallingford, UK: CABI Publishing.
- Cattara, V.,** Dawn, A., Cirvilleri, G. and Vivian, A. (2000). Specific oligonucleide primers for the rapid identification and detection of the agent of tomato pith necrosis, *Pseudomonas corrugata*, by PCR amplification: evidence for two diostinct genomic groups. EJPP 106: 753-762.
- Cattara, V.,** Gardan, L. and Lopez, M.M. (1997). Phenotypic heterogeneity of *Pseudomonas corrugata* strains from southern Italy. Journal of Applied Microbiology 83, 576-586.
- Cattara, V.** (2007). *Pseudomonas corrugata*: plant pathogen and/or biological resource? Molecular Plant Pathology 8 (3), 233-244.
- Cattara, V.,** Sutra, L., Morineau, A., Achouak, W., Christen, R. and Gardan, L (2002). Phenotypic and genomic evidence for the revision of *Pseudomonas corrugata* and proposal of *Pseudomonas mediterranea* sp.nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 52, 1749-1758.
- Chun, W.** and Leary, J.V. (1989). Novel toxin produced by *Pseudomonas corrugata*, the causal agent of tomato pith necrosis. Phytotoxins and Plant Pathogenics (Granti A., Durbin R.D. and Ballio A., eds), Berlin, Springer-Verlag: 93-116.
- Cirvilleri, G.,** Bella, P. and Cattara, V. (2001). Biocontrol activity in plant pathogenic *Pseudomonas* species. Proceedings 5th Congress of the European Foundation for Plant Pathology, 534-538.
- Corsaro, N.M.,** Piaz, F. D., Lanzetta, R., Naldi, T., Parrilli, M. (2004). Structure of Lipid A from *Pseudomonas corrugata* by electrospray ionization quadropole time-of-flight tandem mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom 18: 853-858.
- Cother, E. J.,** Sivasthamparam, K. (1983). *Erwinia*: The “*carotovora*” Group (In: Plant Bacterial Diseases. A Diagnostic Guide. (Eds. Fahy, P. C. and Persley). Academic Press, Australia.

- Cottyn, B.**, Van Outryve, M. F., Cerez, M.T., De Cleene, M., Swings, J. and Mew, T. W. (1996). Bacterial diseases of rice. II. Characterization of pathogenic bacteria associated with sheath root complex and grain discoloration of rice in the Philippines. *Plant Dis.* 80: 438-445.
- Cirvilleri, G.**, Bella, P. and Cattara, V. (2000). Luciferase Genes as a marker for *Pseudomonas corrugata*. *Journal of Plant Pathology*, 82 (3), 237-241.
- Daniel, K.**, Solaiman, Y. Cattara V. and Greco, S. (2005). Poly(hydroxyalkanoate) synthase genotype and PHA production of *Pseudomonas corrugata* and *P. mediterranea*. *Journal Ind Microbiology Biotechnology*, 32: 75-82.
- Demir, G.** (1990). The occurrence of *Pseudomonas corrugata* on tomatoes in Turkey. *Journal of Turkish Phytopathology* 19, 63-70.
- Dhanvantari, B.N.** (1990). Stem necrosis of greenhouse tomato caused by a novel *Pseudomonas* sp. *Plant Disease*, 74 (2): 124-127.
- Dumenio, C.K.**, Mukherjee, A., Chun, W. and Chatterjee, A.K. (1998). Genetic and physiological evidence for the production of N-acyl homoserine lactones by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and other fluorescent plant pathogenic *Pseudomonas* species. *Eur. J. Plant Pathology* 104: 569-582.
- Elasri, M.**, Delorme, S., Lemanceau, P., Steward, G., Laue, B., Glickmann, E., Oger, P.M. and Dessaux, Y. (2001). Acyl-homoserine lactone production is more common among plant-associated *Pseudomonas* spp. than among soilborne *Pseudomonas* spp. *Appl. Environmental Microbiol.* 67: 1198-1209.
- Emanuele, M.C.**, Scaloni, A., Lavermeiacoca, P., Jacobellis, N. S., Camoni, L., Di Giorgio, D., Pucci, P., Paci, M., Segre, A., Ballio, A. (1998). Corpeptins, new bioactive lipodepsipeptides from cultures of *Pseudomonas corrugata*. *FEBS Lett* 433: 317-320.
- Fernando, W.G.D.**, Ramarathnam, R., Krishnamoorthy, A. S. and Savchuk, S. C. (2005). Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. *Soil Biol. Biochem.* 37: 955-964.

- Fett, W.F., Cescutti, P. and Wijey, C. (1996).** Exopolisaccharides of the plant pathogens *Pseudomonas corrugata* and *Ps. Flevescens* and the saprophyte *Ps. Chloropsis*. *J. Applied Bacteriology* 81: 181-187.
- Fiori, M (1992).** A new bacterial disease of chrisantemum: a stem rot by *Pseudomonas corrugata* Roberts & Scarlet. *Phytopathol. Med.* 31: 110-114.
- Garbeva, P., Van Overbeek, L.S., van Vuurde, J.W.L. and Van Elsas, J. D. (2001).** Analysis of endophytic bacterial communities of potato by platin and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of 16S rDNA based BCR fragments. *Microb. Ecol.* 41: 369-383.
- Gulensoy, N. and Alvarez, P.J.J (1999).** Diversity and correlation of specific aromatic hydrocarbon biodegradation capabilities. *Biodegradation* 10: 331-340.
- Heinary, E., Truu, J., Stottmeister, U. and Heinary, A. (2000).** Three types of phenol and p-cresol catabolism in phenol- and p-cresol-degrading bacteria isolated from river water continuously polluted with phenolic compounds. *FEMS Microbiol. Ecol.* 31: 195-205.
- Izrailskij, V.P. (1960).** Bakterijalne bolezni rastenij. Selhozgiz, Moskva.
- Jones, J. B., Jones, J. P., Stall, R. E. (1983).** Occurrence of stem necrosis on field-grown tomatoes incited by *Pseudomonas corrugata* in Florida. *Pl. Disease*, 67, 425-426.
- Kadouri, D., Jurkevitch, E., Okon, Y. and Castro-Sowinski, S. (2005).** Ecological and agriculture significance of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Crit. Rev. Microbiol.* 31: 1-13.
- Klement, Z., Rudolph, K. and Sands, D.C. (1990).** Methods in Phytobacteriology. Akademiai Kiado, Budapest.
- Kovacevich, P. A. and Ryder, M.H. (1991).** Biocontrol performance characterization of *Pseudomonas corrugata* isolates PS 2140 and PS 2161. *Phytopathology*, 81: 1178.
- Kondratenko, E.V., Bykova, G.A., Sergeeva, M.E. & Kozlov, L.P. (1994).** Production of diagnostic serum for *Pseudomonas corrugata* and its analysis in immunological tests. In: Zaharenko V.A & Matveeva E.V., eds. Proc. All-Russian Conference. Bacterial diseases of potato and

vegetable cultures and methods of their control. Moscow: RASKHN, 82-84.

- Kupier, I.,** Lagendijk, E.L., Bloemberg, G.V. and Lugtenberg, B.J.J. (2004). Rhizoremediation: a beneficial Plant-Microbe Interaction. Mol. Plant-Microbe Interactions, 17: 6-15.
- Lelliott, R. A.,** Stead, D. E., (1987). Methods for the Diagnosis of Bacterial Disease of Plants. William Clowes Limited, Baccles and London.
- Lopez, M. M.,** F. R. Rodrigues, A. M. Montojo, R. J. Salcedo and R. J. Marti. (1988). Pepper, a new host of *Pseudomonas corrugata*, p. 98 Abstr. 5th Int. Congr. Plant Pathology.
- Lopez, M. M.,** Siverio, F., Albiach, R., Garcia, F. and Rodrigues, F.R. (1994). Characterization of Spanish isolates of *Pseudomonas corrugata* from tomato and pepper. Plant pathology 43: 80-90.
- Lukezic, F. L.** (1979). *Pseudomonas corrugata*, a pathogen of tomato isolated from symptomless alfalfa roots. Phytopathology 69: 27-31.
- Madson, L.L.** and Huisman, G.W.(1999). Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 63: 21-53.
- Mark, G.L.,** Morrissey, J.P., Higgins, P. and O’Gara, F. (2006). Molecular based strategies to exploit *Pseudomonas* biocontrol strains for environmental biotechnology applications. FEMS Microbiol. Ecol. 56: 167-177.
- Magyarosy, A. C.** and Buchanan, B.B. (1995). First report of *Pseudomonas corrugata* causing pith necrosis on geraniums. Phytopathology, 85: 1040.
- Mijatović, M.,** Marinković, N., Marković, Ž., Aleksić, Ž. (1988). *Pseudomonas* sp., prouzrokovac nekroze srži i uvenuca paradajza. Zaštita bilja, Beograd. 39 (1): 89-93.
- Митрев, С.,** Билјана Ковачевиќ, Емилија Накова и Спасов Д. (2007). *Pseudomonas agglomerans* и *Pseudomonas* sp., причинители на гниее на стеблото кај домотот. Заштита на растенијата XIX, Скопје, 94-98.

- Mitrev, S.** and Biljana Kovacevik (2006). Characterization of bacterial strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* isolated from pepper in Macedonia. *Journal of Plant Pathology*, 88 (3), 321-324.
- Mitrev, S.,** Gardan L., Samson R. (2000). Characterization of bacterial strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* isolated from pepper leaf spot in Macedonia. *Journal of Plant Pathology*, 82 (3), 227-231.
- Mitrev, S.** and Pejcinovski F. (1999). *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* the causal of black spots on leafs and scabs of tomato fruits in condition of greenhouse production. *Yearbook for Plant Protection, Skopje Vol. X:* 141-151.
- Mitrev, S.** (1996). *Pseudomonas viridiflava* the causal of the pathogenic changes by tomato fruits. *Acta Horticulturae Number 462, Proceedings of the Balkan Symposium on the Vegetables and Potatoes, Belgrade.*
- Mitrev S.** (1995). Bacterial cancer of tomato caused by bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith 1910) Jensen 1934 in Strumica district. *Yearbook for Plant Protection, Skopje, Vol. VI,* 33-38.
- Molan, Y.** and Ibrehim, Y. (2007). First report of tomato (*Lycopersicon esculentum*) pith necrosis caused by *Pseudomonas fluorescens* and *P. corrugata* in the Kingdom of Saudi Arabia. *Plant Disease* 91 (1): 110.
- Moura, M.L.,** Jacques, M.A., Brito, L.M., Mourao, I.M. and Duclos, J. (2005). Tomato Pith Necrosis (TPN) caused by *P. corrugata* and *P. mediterranea*: severity of damages and crop loss assessment. *Acta Hort. (ISHS)*, 695, 365-372.
- Nishiyama, K.,** Yamamoto, T., Umekawa, M., Ezuka, A. (1979). Bacterial spot of tomato caused by *Pseudomonas viridiflava*. *Ann. Phytopath.Soc. Japan*, 45, 221-227.
- Olivera, E.R.,** Carnicero, D., Jodra, R., Minambres, B., Garcia, B., Abraham, G.A., Gallardo, A., Roman, J.S., Garcia, J.L., Naharro, G. and Lungo, J.M. (2001). Genetically engineered *Pseudomonas*: a factory of new bioplastics with broad applications. *Environ. Microbiol.* 3: 612-618.
- Padaga, M.,** Heard, G.M., Paton, J. E. and Fleet, G. H. (2000). Microbial species associated with different sections of broccoli harvested from three regions in Australia. *Int.J. Food Microbiology*, 60: 15-24.

- Pandey, A.** and Palni, L. M. S. (1998). Isolation of *Pseudomonas corrugata* from Sikkim Himalaya. World Journal of Microbiology & Biotechnology 14: 411-413.
- Pandey, A.,** Anjala, D., Mukesh, J., Lok, M.S.P., (1999). Influence of *Pseudomonas corrugata* inoculation on root colonization and growth promotion of two important hill crops. Microbiol. Res. 154: 259-266.
- Pandey, A.,** Palni, L. M. S. and Hebbar, K. P. (2001). Suppression of damping-off in maize seedlings by *Pseudomonas corrugata*. Microbiol. Res. 156: 191-194.
- Pandey, A.,** Palni, L. M. S. and Niladri, B. (2000). Biological hardening of tissue culture raised plants through rhizosphere bacteria. Biotechnol. Lett. 22: 1087-1091.
- Pandey, A.,** Lok, M.S.P., Pariksha, M. and Nadeem, M. (2002). Effect of Temperature on solubilization of tricalcium phosphate by *Pseudomonas corrugata*. Journal of Scientific & Industrial Research, 61, 457-460.
- Paulitz, T.,** Zhou, C. and Rankin, L. (1992). Selection of rhizosphere bacteria for biological control of *Pythium aphanidermatum* on hydroponically grown cucumber. Biol. Control 2: 226-237.
- Popkova, K.V.** and Nosova, O.N. (1991). Pith Necrosis of stem of tomato and basis for its control. In: Sinukov I.I., ed. News of Timiryasevskaya agricultural academy. Moscow: Agropromizdat, 5: 89-96.
- Risse, D.,** Beiderbeck, H., Taraz, K., Budzikiewicz, H., Gustine, D. (1998). Bacterial constituents part LXXVII. Corrugatin, a lipopeptide siderophore from *Pseudomonas corrugata*. Z Naturforsch C 53: 295-304.
- Rodrigues-Alvarado, G.,** Holguin-Pena, J., Ochoa-Alvarez N., Fernandes-Pavia, S.P., Geraldo-Verdugo, J.A. (2002). *Pseudomonas corrugata* causing Pith Necrosis on Tomato plants in Baja California Sur, Mexico. Plant Disease 86(5): 563.
- Rohlf FJ.,** (1994). NTSYS-Pc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, V. 1-80. New York, USA: Exeter Software.

- Ryder, M.H. and Borrett, M.A. (1991).** Root colonization by non fluorescent *Pseudomonads* used for the control of wheat take all. Bull. SROP. 14: 302-307.
- Ryder, M.H. and Rovira, A.D. (1993).** Biological control of take-all of glasshouse grown wheat using strains of *Pseudomonas corrugata* isolated from wheat field soil. Soil Biol. Biochem. 25: 311-320.
- Ryder, M.H., Yan, Z., Terrace, T.E., Rovira, A.D., Tang, W.H. and Correll, R.L. (1999).** Use of strains *Bacillus* isolated in China to suppress take-all and *Rhizoctonia* root rot, and promote seedling growth of glasshouse-grown wheat in Australian soils. Soil Biol. Biochem. 31: 19-29.
- Sahin, F., Aysan, Y. and Saygili, H. (2004).** The first observation of pith necrosis on tomato caused by some *Pseudomonas* species in Turkey. Acta Horticulturae 695: 291-293.
- Saygili, H., Aysan, Y., Sahin, F., Ustun, N. and Mirik, M. (2004).** Occurrence of pith necrosis caused by *Pseudomonas fluorescens* on tomato plants in Turkey. Plant Pathology 53 (6): 803.
- Saygili, H., Aysan, Y., Ustun, N., Mirik, M. and Sahin, F. (2006).** Tomato Pith Necrosis Disease caused by *Pseudomonas* species in Turkey.
- Scaloni, A., Dalla Serra, M., Amodeo, P., Mannina, L., Vitale, R.M., Segre, A.L., Cruciani, O., Lodovichetti, F., Greco, M.L., Fiore, A., Gallo, M., D'Ambrosio, C., Coraiola, M., Menestrina, G., Graniti, A. and Fogliano, V. (2004).** Structure, conformation and biological activity of a novel lipodepsipeptide from *Pseudomonas corrugata*: Cormycin A. Bioshem J 384: 25-36.
- Schaad, N. W. (1980).** Laboratory Guide for the Identification of Plant Pathogenic Bacteria. Bacteriology Committee of the APS St. Paul, Minnesota, USA, 72.
- Schaad, N. W. (2001).** Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. American Phytopathogen Society, St. Paul, Minnesota.
- Schisler, D.A. and Slininger, P.J. (1994).** Selection and performance of bacterial strains for biologically controlling *Fusarium* dry root of potatoes incited by *Gibberella pulicaris*. Plant Disease 78: 251-255.

- Scorticini, M.** (1989). Occurrence in soil and primary infections of *Pseudomonas corrugata* Roberts & Scarlet. J Phytopathology 125: 33-40.
- Scarlett, C.M., Fletcher, J.T., Roberts, P. and Lelliott, R.A.,** (1978). Tomato pith necrosis caused by *Pseudomonas corrugata* n.sp. Ann. Appl. Biol. 88: 105-114.
- Siverio, F., Cambra, M., Gorris, M.T., Corzo, J. and Lopez, M.M.** (1993). Lipopolysaccharides as determinants of serological variability in *Pseudomonas corrugata*. Applied and Environmental Microbiology 59: 1805-1812.
- Siverio, F., Carbonell, E.A., Garcia, F. and Lopez, M.M.** (1996). Characteristics of the whole cell fatty acid profiles of *Pseudomonas corrugata*. Eur. J. Plant Pathology 102: 519-526.
- Snell, K.D., Peoples, O.P.** (2002). Polyhydroxyalkanoate polymers and their production in transgeneic plants. Metabol Eng 4: 29-40.
- Solaiman, D.K., Cattara, V. and Greco, S.** (2005). Poly(hydroxyalkanoate) synthase genotype and PHA production of *Pseudomonas corrugata* and *Pseudomonas mediterranea*. J. Ind. Microbial. Biotechnol. 32: 75-82.
- Solaiman, D.K.Y., Ashby, R.D., Hotchkiss, A.T. and Foglia, T.A.** (2006). Biosynthesis of medium-chain-length poly (hydroxyalkanoates) from soy molasses. Biotechnol. Lett. 28: 157-162.
- Stead, D.E.** (1992). Grouping of plant – pathogenic and some other *Pseudomonas* spp. by using cellular fatty acid profiles. Int. J. Syst. Bacteriology 42: 281-295.
- Sutra, L., Siverio, F., Lopez, M.M., Hunault, G., Bollet, C. and Gardan, L.** (1997). Taxonomy of *Pseudomonas* strains isolated from Tomato Pith Necrosis: emended Description of *Pseudomonas corrugata* and proposal of three unnamed fluorescent *Pseudomonas* genomospecies.
- Туцаров, Т.** (1990). Домати. Наша книга, Скопје стр: 1- 65.
- Tranprasert, P. and Reed, B.M.** (1997). Detection and identification of bacterial contamination from strawberry runner explants. In Vitro Cell Dev. Biol. Plant. 33: 221-226.

- Triverdi, P. and Sa, Y. (2008).** *Pseudomonas corrugata* (NRRL B-30409) Mutants increased Phosphate Solubilization, organic acid production and plant growth at lower temperatures. *Current Microbiology* 56 (2): 140-144.
- Tuite, J.(1969).** Plant Pathological methods – Fungi and Bacteria. Burgess Publishing Co., Minneapolis, MN. 239 pp.
- Ustun, N. and Saygili, H. (2001).** Pith necrosis of greenhouse tomatoes in Aegean region of Turkey. 11th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union and 3rd Congress of the Sociedade Portuguesa de Fitopatologia. Evora, Portugal 17-20 September, 70-73.
- Wilkie, J. P., Dye, D.W. (1974).** *Pseudomonas cichorii* causing tomato and celery diseases in New Zealand. *N. Z. Journal of Agric.Research*, 17, 123-130.
- Wilkie, J. P., Dye, D.W., Watson, D. R. W. (1973).** Further hosts of *Pseudomonas viridiflava*. *N. Z. Journal of Agriculture. Res*, 16, 315-323.
- Walker, C., Goodyear, C., Anderson, D. and Titball, R.W. (2000).** Identification of arsenic resistant bacteria in the soil of a former munitions factory at Locknitz, Germany. *Land Contamination Reclamation* 8: 13-18.
- Zhou, T. and Paulitz, T.C. (1993).** *In vitro* and *in vivo* effects of *Pseudomonas* spp. on *Pythium aphanidermatum*: zoospore behavior in exudates and on the rhizoplane of bacteria treated cucumber roots. *Phytopathology* 83: 872-876.
- Zhou, T. and Paulitz, T.C. (1994).** Induced resistance in the biological control of *Pythium aphanidermatum* by *Pseudomonas* spp. on European cucumber. *J. Phytopathology* 142: 51-63.

Билјана Ковачевиќ

**ПРОУЧУВАЊЕ НА ПРИЧИНИТЕЛОТ НА НЕКРОЗАТА НА
СТЕБЛЕНАТА СРЖ НА ДОМАТОТ - *PSEUDOMONAS MEDITERRANEA*
CATTARA ET AL., 2002, ВО МАКЕДОНИЈА
Универзитет „Гоце Делчев“ – Штип**

2010